

**ESTUDO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO
INIBIDOR DA FAAH URB597 NA NEUROTOXICIDADE
CAUSADA PELO CONSUMO DE ÁLCOOL EM *BINGE*
POR RATOS ADOLESCENTES.**

RENAN PELIÇÃO

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

**Mestrado em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo**

2014

ESTUDO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO INIBIDOR DA FAAH URB597 NA NEUROTOXICIDADE CAUSADA PELO CONSUMO DE ÁLCOOL EM *BINGE* POR RATOS ADOLESCENTES

RENAN PELIÇÃO

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 08/12/2014 por:

Prof.^a Dr.^a Livia Carla de Melo Rodrigues – Orientadora, UFES

Prof.^a Dr.^a Suely Gomes de Figueiredo – Co-orientadora, UFES

Prof. Dr. Antônio Lúcio Teixeira – Membro externo, UFMG

Prof. Dr. Marcelo Perim Baldo, UFES

Prof.^a Dr.^a Ivanita Stefanon - Coordenadora do PPGCF, UFES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Vitória, outubro de 2014

Pelição, Renan 1986

Estudo do efeito neuroprotetor do inibidor da FAAH URB597 na neurotoxicidade causada pelo consumo de álcool em *binge* por ratos adolescentes. [Vitória] 2014

xv, 92 p., 29,7cm (UFES, M. Sc., Ciências Fisiológicas, 2014)

Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF

I – Neurotoxicidade das drogas de abuso

II – PPGCF/CCS/UFES

III – Estudo do efeito neuroprotetor do inibidor da FAAH URB597 na neurotoxicidade causada pelo consumo de álcool em *binge* por ratos adolescentes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela possibilidade de me permitir ver mais uma etapa da minha vida concluída e por proporcionar a formação de amizade com pessoas que agora são muito queridas.

Agradeço a Prof.^a Suely por ter me apresentado ao fascinante mundo da pesquisa e por me acolher em seu laboratório.

Agradeço a Prof.^a Livia por todo suporte, compressão, auxílio, incentivo e também por mostrar que com muito esforço, trabalho e um sorriso no rosto é possível vencer qualquer obstáculo.

Agradeço também aos meus dois amigos Matheus e Amanda por todo apoio e pelos momentos de distração e confusão que aprontaram nesse período.

A Prof.^a Ester pela liberdade que me deu em seu Laboratório, pela atenção dada em momentos de dúvida e por todo rico conhecimento compartilhado.

Aos amigos Juliana, Jozué, Cleciane, Marcelo, Jaísa, Micheli e todos outros que de alguma forma me ajudaram a concluir meu trabalho.

Agradeço a todo suporte dado pelos laboratórios LQP, LCCNPF, LTCC da UFES e ao Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica - LIIM e ao Laboratório de Imunofarmacologia da UFMG, pois sem essa oportunidade oferecida gratuitamente eu não poderia ter realizado esse trabalho. Em especial, agradeço a Aline, Érica, Soraia, Paula e aos Professores Antônio Lúcio e Antônio Carlos pela abertura de seus laboratórios e acolhimento.

A minha família por todo apoio e compreensão nos momentos difíceis e em especial a meus pais pela formação e educação que me permitiram realizar tantos sonhos.

A minha querida esposa Vanessa, pelo apoio incondicional e todo carinho e amor que compartilha comigo. Obrigado por existir em minha vida, por embarcar em meus sonhos e por torná-los reais.

Dedico esse trabalho a Vanessa,
por todo amor e apoio.

“Um leitor vive mil vidas antes de morrer, o homem que nunca lê vive apenas uma.”

George R. R. Martin

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
RESUMO.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 O consumo de álcool no Brasil e no mundo.....	17
1.2 Uso de álcool na adolescência.....	19
1.3 Ação e efeitos do álcool no SNC.....	19
1.4 Indução de estresse oxidativo pelo álcool.....	22
1.5 Neuroinflamação e marcadores inflamatórios.....	26
1.6 Neuroinflamação induzida pelo consumo de álcool.....	29
1.7 BDNF e o álcool.....	30
1.8 Hipocampo.....	31
1.9 CPF.....	31
1.10 Sistema endocanabinóide.....	33
2 OBJETIVOS.....	38
2.1 Objetivo geral.....	38
2.2 Objetivos específicos.....	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 Animais.....	39
3.2 Reagentes.....	39
3.3 Desenho experimental.....	39
3.4 Concentração de álcool no sangue.....	40
3.5 Marcação com o DHE.....	40
3.6 Quantificação dos níveis de BDNF e citocinas.....	41
3.7 Tarefa de reconhecimento de objetos.....	42
3.8 Análise estatística.....	44
4 RESULTADOS.....	45
4.1 Concentração de álcool no sangue.....	45
4.2 Determinação do estresse oxidativo pelo ensaio do dihidroetídeo.....	45
4.3 Quantificação do BDNF e citocinas.....	47
4.4 TRO.....	58
5 DISCUSSÃO.....	61
6 CONCLUSÕES.....	71
7 REFERÊNCIAS.....	72

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Definição de dose padrão de álcool.....	18
FIGURA 2 - Sistema enzimático de metabolização do álcool.....	20
FIGURA 3 - Esquema do sistema antioxidante enzimático.....	24
FIGURA 4 - Utilização da planta Cannabis durante a história.....	33
FIGURA 5 - Síntese e sinalização retrógrada do sistema endocanabinóide.....	36
FIGURA 6 - Esquema do TRO.....	43
FIGURA 7 - Comparação do teor alcoólico no sangue dos animais.....	45
FIGURA 8 - Comparação do estresse oxidativo pela técnica do DHE entre os grupos <i>Binge</i> Agudo e <i>Binge</i> Agudo + URB 597.....	46
FIGURA 9 - Comparação entre os grupos <i>Binge</i> Agudo (A) e <i>Binge</i> Agudo + URB597 (B) utilizando DHE para a expressão de ROS em secções longitudinais de tecido cerebral (CPF), magnificação em 10x.....	46
FIGURA 10 - Comparação do estresse oxidativo pela técnica do DHE entre os grupos <i>Binge</i> Crônico e <i>Binge</i> Crônico + URB 597.....	47
FIGURA 11 - Comparação entre os grupos <i>Binge</i> Crônico (A) e <i>Binge</i> Crônico + URB597 (B) utilizando DHE para a expressão de ROS em secções longitudinais de tecido cerebral (CPF), magnificação em 10x.....	47
FIGURA 14 – Comparação da dosagem de BDNF no CPF entre os grupos <i>Binge</i> Agudo e <i>Binge</i> Agudo + URB 597.....	48

FIGURA 13 - Comparação da dosagem de BDNF no hipocampo entre os grupos <i>Binge</i> Agudo e <i>Binge</i> Agudo + URB 597.....	48
FIGURA 14 - Comparação da dosagem de BDNF no CPF entre os grupos <i>Binge</i> Crônico e <i>Binge</i> Crônico + URB 597.....	49
FIGURA 15 - Comparação da dosagem de BDNF no hipocampo entre os grupos <i>Binge</i> Crônico e <i>Binge</i> Crônico + URB 597.....	49
FIGURA 16 - Comparação da dosagem de IFN- γ no CPF entre os grupos <i>Binge</i> Agudo e <i>Binge</i> Agudo + URB 597.....	50
FIGURA 17 - Comparação da dosagem de IFN- γ no hipocampo entre os grupos <i>Binge</i> Agudo e <i>Binge</i> Agudo + URB 597.....	50
FIGURA 18 - Comparação da dosagem de IFN- γ no CPF entre os grupos <i>Binge</i> Crônico e <i>Binge</i> Crônico + URB 597.....	51
FIGURA 19 - Comparação da dosagem de IFN- γ no hipocampo entre os grupos <i>Binge</i> Crônico e <i>Binge</i> Crônico + URB 597.....	52
FIGURA 20 - Comparação da dosagem de TNF- α no CPF entre os grupos <i>Binge</i> Agudo e <i>Binge</i> Agudo + URB 597.....	52
FIGURA 21 - Comparação da dosagem de TNF- α no hipocampo entre os grupos <i>Binge</i> Agudo e <i>Binge</i> Agudo + URB 597.....	53
FIGURA 22 - Comparação da dosagem de TNF- α no CPF entre os grupos <i>Binge</i> Crônico e <i>Binge</i> Crônico + URB 597.....	53
FIGURA 23 - Comparação da dosagem de TNF- α no hipocampo entre os grupos <i>Binge</i> Crônico e <i>Binge</i> Crônico + URB 597.....	54

FIGURA 24 - Comparação da dosagem de IL-4 no CPF entre os grupos <i>Binge</i> Agudo e <i>Binge</i> Agudo + URB 597.....	54
FIGURA 25 - Comparação da dosagem de IL-4 no hipocampo entre os grupos <i>Binge</i> Agudo e <i>Binge</i> Agudo + URB 597.....	55
FIGURA 26 - Comparação da dosagem de IL-4 no CPF entre os grupos <i>Binge</i> Crônico e <i>Binge</i> Crônico + URB 597.....	55
FIGURA 27 - Comparação da dosagem de IL-4 no hipocampo entre os grupos <i>Binge</i> Crônico e <i>Binge</i> Crônico + URB 597.....	56
FIGURA 28 - Comparação da dosagem de IL-10 no CPF entre os grupos <i>Binge</i> Agudo e <i>Binge</i> Agudo + URB 597.....	56
FIGURA 29 - Comparação da dosagem de IL-10 no hipocampo entre os grupos <i>Binge</i> Agudo e <i>Binge</i> Agudo + URB 597.....	57
FIGURA 30 - Comparação da dosagem de IL-10 no CPF entre os grupos <i>Binge</i> Crônico e <i>Binge</i> Crônico + URB 597.....	57
FIGURA 31 - Comparação da dosagem de IL-10 no hipocampo entre os grupos <i>Binge</i> Crônico e <i>Binge</i> Crônico + URB 597.....	58
FIGURA 32 - Comparação da memória st no teste de reconhecimento de objetos (TRO) entre os grupos <i>Binge</i> Agudo e <i>Binge</i> Agudo + URB 597.....	58
FIGURA 33 - Comparação da memória It no TRO entre os grupos <i>Binge</i> Agudo e <i>Binge</i> Agudo + URB 597.....	59
FIGURA 34 - Comparação da memória st no TRO entre os grupos <i>Binge</i> Crônico e <i>Binge</i> Crônico + URB 597.....	60

FIGURA 35 - Comparação da memória It no TRO entre os grupos <i>Binge</i> Crônico e <i>Binge</i> Crônico + URB 597.....	60
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Principais espécies reativas do oxigênio.....22

TABELA 2 - Principais espécies reativas do nitrogênio.....23

TABELA 3 - Resumo dos marcadores inflamatórios avaliados nesse estudo....29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG	2-aracnodoilglicerol
AA	Ácido araquidônico
ACTH	Hormônio adenocorticotrófico
AD	Álcool desidrogenase
AEA	Anandamida
ALD	Aldeído desidrogenase
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CAT	Catalase
CB	Receptores canabinóides
CB1	Receptor canabinóide tipo 1
CB2	Receptor canabinóide tipo 2
COX-2	Ciclooxigenase-2
CPF	Córtex pré-frontal
CRH	Corticotrofina
CSFs	Fatores estimuladores de colônias
CYP2E1	Enzima citocromo P450 2E1
DAG Lipase	sn-1-diacilglicerol lipase seletiva
DHE	Dihidroetidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FAAH	Hidrolase amida de ácido graxo
TGFβ	Fator transformador de crescimento β
GABA	Ácido gama-aminibutírico
GPx	Glutationa peroxidase
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HNO₂-	Óxido nitroso
HRO₂·	Radical hidroperoxil
i.p.	Via intraperitoneal
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-1Rα	Antagonista do receptor IL-1
IL-1α	Interleucina 1 α

IL-1β	Interleucina 1 β
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IFN-γ	Interferon gama
iNOS	Óxido nítrico sintase
LPS	Lipopolissacarídeo
MGL	Lipase monoacilglicerol
NAPE-PLD	N-acilfosfatidiletanolamida-fosfolipase D
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NO$^{\cdot}$	Radical óxido nítrico
NO$_2^{\cdot-}$	Radical dióxido de nitrogênio
NT-3	Neurotrofina 3
NT-4/5	Neurotrofina 4/5
NT-6	Neurotrofina 6
NT-7	Neurotrofina 7
O$_2^{\cdot-}$	Radical superóxido
ODP	Ø-fenileno-diamina
OH$^{\cdot}$	Radical hidroxil
ONOO-	Peróxinitrito
PAF	Fator ativador plaquetário
PBS	Tampão fosfato salina
PGE2	Prostaglandina E2
PPAR	Receptores ativados por proliferadores de peroxissomas
RL	Radical livre
RO$_2^{\cdot}$	Radical peroxil
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
THC	Δ -9 tetrahidrocanabinol
TLR	Toll like receptor
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TrkB	Receptor de alta afinidade tirosina quinase B
TRO	Tarefa de reconhecimento de objetos

RESUMO

O consumo pesado episódico (*binge*) de álcool durante a adolescência pode trazer sérias consequências neurotóxicas, especialmente para áreas cerebrais como o córtex pré-frontal (CPF), de amadurecimento tardio e envolvido no abuso e dependência de drogas e em processos cognitivos, e o hipocampo, relacionado à memória declarativa. O sistema endocanabinóide parece estar relacionado à neuroproteção, uma vez que muitos estudos demonstram que a ativação de seus receptores diminui os o estresse oxidativo e a resposta inflamatória em doenças do sistema nervoso central. Considerando a hipótese que os endocanabinóides podem proteger o cérebro dos prejuízos causados pelo consumo de etanol em *binge*, esse estudo investigou o efeito do inibidor da enzima de metabolização do endocanabinóide anandamida (hidrolase amida de ácidos graxos – FAAH), o URB597, no estresse oxidativo e neuroinflamação induzidos pelo consumo de álcool em *binge* agudo ou crônico por ratos adolescentes. Para tanto os animais foram submetidos à administração Intraperitoneal (IP) de URB597 (0.3 mg/kg) ou veículo seguidos, após 40 minutos, da administração Intragástrica (IG) de etanol (3 e 6 g/kg) ou água destilada em 3 sessões consecutivas (*binge* agudo) ou 3 sessões consecutivas durante 4 semanas (*binge* crônico). Os animais dos grupos *binge* agudo e crônico também foram submetidos ao teste de reconhecimento de objetos. Os resultados demonstram que o álcool em *binge* agudo nas doses de 3 e 6 g/kg e crônico na dose de 6 g/kg induziu estresse oxidativo no CPF, e o tratamento prévio com URB597 reduziu esse efeito. O consumo de álcool em *binge* crônico nas doses de 3 e 6 g/kg aumentou os níveis da neurotrofina BDNF e da citocina pró-inflamatórias TNF- α no CPF e hipocampo de ratos adolescentes. O tratamento prévio com o URB597 foi capaz de reduzir os níveis de BDNF e TNF- α . O álcool em *binge* crônico também aumentou os níveis da citocina IL-10 nas doses de 3 e 6 g/kg no CPF de ratos adolescentes. O tratamento prévio com o URB597 foi capaz de reduzir esse aumento. O consumo de álcool em *binge* agudo na dose de 3 g/kg prejudicou a memória de longo prazo (24 h) de ratos adolescentes na tarefa de reconhecimento de objetos, e o tratamento prévio com o URB597 reduziu esse prejuízo. Para o *binge* crônico o consumo de álcool na dose de 6 g/kg prejudicou a memória de longo prazo na tarefa de reconhecimento de objetos. Entretanto a administração prévia de URB597 não foi capaz de reduzir esse efeito de prejuízo. Em síntese, os resultados deste estudo apontam para o envolvimento do sistema endocanabinóide na neuroproteção contra a neurotoxicidade causada pelo consumo de álcool em *binge* por ratos adolescentes.

ABSTRACT

The heavy episodic drinking or binge drinking of alcohol during adolescence may bring serious neurotoxic consequences, especially to cerebral areas such as the prefrontal cortex (PFC), late maturing and involvement in the abuse and drug dependence in cognitive processes, and the hippocampus, related to declarative memory. The endocannabinoid system seems to be related to neuroprotection, since many studies demonstrate that the activation of its receptors reduces the oxidative stress and the inflammatory response in central nervous system diseases. Considering the hypotheses that the endocannabinoids may protect the brain from damage caused by the consumption of ethanol in binge drinking, this study investigated the effect of the metabolic enzyme of the anandamida endocannabinoid (fatty acid amide hydrolase – FAAH) inhibitor, the URB597, in the oxidative stress and neuroinflammation induced by the consumption of alcohol in acute or chronic binge drinking in adolescent rats. Each of the animals were submitted to the Intraperitoneal injection (IP) of URB597 (0.3 mg/kg) or also followed by, after 40 minutes, the Intragastric injection (IG) of ethanol (3 and 6 g/kg) or distilled water in 3 consecutive sessions (acute bingeing), or 3 consecutive sessions during a 4 week period (chronic bingeing). The animals of the acute and chronic bingeing groups were also submitted to object recognition tests. The results demonstrated that the alcohol in acute binge drinking in 3 and 6 g/kg doses and chronic binge drinking in 6 g/kg doses induced oxidative stress in the PFC, and the pretreatment with URB597 reduced this effect. The consumption of alcohol in chronic binge drinking in 3 and 6 g/kg doses raised the levels of neurotrophin BDNF and the proinflammatory cytokines TNF- α in the PFC and hippocampus of the adolescent rats. The pretreatment with URB597 was able to decrease the levels of BDNF and TNF- α . The consumption of alcohol in binge drinking in 3 g/kg doses impaired the long-term memory (24 h) of adolescent rats in relation to recognizing objects, and the pretreatment with URB597 reduced this loss. The chronic binge drinking of alcohol in 6 g/kg doses impaired the long-term memory in relation to object recognition testing, but the pretreatment with URB597 was unable to decrease the effect of the impairment. In summary, the results of this study indicate the involvement of the endocannabinoid system in the neuroprotection against neurotoxicity caused by the consumption of binge drinking alcohol in adolescent rats.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O consumo de álcool no Brasil e no mundo

O consumo de bebidas alcoólicas é um comportamento adaptado à maioria das culturas e é associado a celebrações, situações de negócio e sociais, cerimônias religiosas e eventos culturais (Meloni & Laranjeira, 2004).

Entretanto, muitos problemas sociais e de saúde estão relacionados ao consumo de álcool em quase todos os países em que seu uso é socialmente aceito (REHM et al., 2009), sendo a causa de mais de 60 tipos de doenças e levando a aproximadamente 2,5 milhões de mortes por ano (WHO, 2011). Dados da Organização Mundial da Saúde também apontam que 4% de todas as mortes do mundo em 2011 foram atribuídas ao álcool, e estima-se que ele seja a causa de 20 a 50% dos casos de cirrose hepática, epilepsia, intoxicação, acidentes rodoviários, violência e a vários tipos de câncer (LARENJEIRA, 2007).

Nos países em desenvolvimento, como o Brasil, as bebidas alcoólicas são um dos principais fatores de doença e mortalidade, com seu impacto deletério sendo considerado entre 8% e 14,9% do total de problemas de saúde dessas nações (LARANJEIRA, 2004; ORT, 2002).

Juntamente com o tabaco, o álcool é a droga mais consumida no Brasil e gera graves transtornos de saúde pública (GALDURÓZ; CAETANO, 2004). Em estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país, considerando indivíduos acima de 12 anos, constatou-se que 74,6% da população já haviam utilizado álcool na vida e que 12,3% eram dependentes dessa substância (GALDURÓZ; CARLINI, 2007).

Atualmente, os pesquisadores direcionam sua atenção sobre os comportamentos relacionados ao consumo de álcool, como, por exemplo, a regularidade, a quantidade e a frequência. O beber em *binge* é o termo empregado para definir o uso pesado episódico do álcool e tem sido alvo de preocupações nas esferas governamentais, civis e na comunidade científica (KUNTSCHE; REHM; GMEL, 2004), pois significa consumir grandes volumes de bebidas alcoólicas num curto espaço de tempo. A definição do beber em *binge* foi estabelecida por inúmeros estudos em cinco doses para homens e quatro doses para mulheres em uma só ocasião (BREWER; SWAHN, 2005). Uma dose corresponde, em média, a uma lata

de cerveja ou chope de 350 ml, uma taça de vinho de 90 ml, uma dose de destilado de 30 ml, uma lata ou uma garrafa pequena de qualquer bebida “ice”. Cada dose contém cerca de 10-12 g de álcool. (II LENAD, 2013).



	Cerveja/chopp	Vinho	Destilados	Dose padrão (álcool puro)
OMS*	330 ml	100 ml	30 ml	10-12 g
NIAAA**	355 ml	150 ml	45 ml	14 g

Figura 1 – Definição de dose padrão de álcool. (CISA, 2014). Fonte: <http://www.cisa.org.br/artigo/4429/relatorio-global-sobre-alcool-saude-2014.php> (acesso em 13/08/2014).

O uso pesado episódico de álcool geralmente está relacionado a uma série de problemas físicos, sociais e mentais, uma vez que importantes modificações neurofisiológicas, tais como desinibição comportamental, comprometimento cognitivo, diminuição da atenção, piora da capacidade de julgamento e diminuição da coordenação motora (NAIMI et al., 2003).

Esse padrão de consumo rápido e pesado pode desencadear intoxicações frequentemente associadas a muitos problemas. Em quase todos os países onde esse fenômeno foi estudado, o beber em *binge*, mesmo que esporádico, causa maiores custos sociais e de saúde do que o uso contínuo e dependente (MÄKELÄ et al., 2001; MILLER; PLANT; PLANT, 2005).

Os principais problemas decorrentes do uso em *binge* do álcool são os acidentes (automobilísticos, quedas, atropelamentos e afogamentos) e a violência (homicídios, roubo, violência doméstica, agressões físicas, violência sexual) (BREWER; SWAHN, 2005).

No Brasil, segundo dados do II Lenad realizado em 2013, o número de pessoas que consumiu álcool pelo menos uma vez no ano caiu de 65% para 62% em relação a 2006. Em contrapartida, 59% dos indivíduos adultos beberam pelo menos uma vez em *binge* no ano de 2012. Isso quer dizer um aumento de 31,1% em relação ao ano

de 2006 e que os 20% dos adultos que mais bebem ingeriram 56% do total de álcool consumido por todos participantes do estudo. Isso demonstra que o padrão de consumo do álcool no país se torna, a cada ano, mais pesado e prejudicial.

1.2 Uso de álcool na adolescência

A adolescência é a fase da vida compreendida entre a infância e a fase adulta e corresponde ao período dos 10 aos 19 anos (WHO, 1986) e no Brasil, o álcool é a primeira droga experimentada nessa faixa etária (FERIGOLO et al., 2004; GALDURÓZ; CAETANO, 2004) e também a droga mais consumida por esse grupo de indivíduos (FERIGOLO et al., 2004; GALDURÓZ; CAETANO, 2004; GALDURÓZ; CARLINI, 2007; SOUZA; SILVEIRA FILHO, 2007; TAVARES, 2001).

Dentre os prejuízos causados pelo consumo de álcool na adolescência, destacam-se: acidentes de trânsito (DUAILIBI; LARANJEIRA, 2007; STOLLE; SACK; THOMASIUS, 2009; WINDLE, 2003), violência (DUAILIBI; LARANJEIRA, 2007; MCCOY et al., 2010; STOLLE; SACK; THOMASIUS, 2009), baixo rendimento escolar (O'MALLEY; JOHNSTON; BACHMAN, 1998; SILVEIRA et al., 2008; SOLDERA et al., 2004; STRAUCH et al., 2009; ZANOTI-JERONYMO; CARVALHO, 2005) e comportamento sexual de risco (BERTONI et al., 2009; SCIVOLETTO et al., 1999; STOLLE; SACK; THOMASIUS, 2009; VIEIRA et al., 2007; ZANOTI-JERONYMO; CARVALHO, 2005).

Um estudo realizado com adolescentes de 14 a 19 anos demonstrou que 11,3% apresentaram um comportamento de abuso e/ou dependência e a prevalência do consumo de álcool em *binge* era de 5,4% no último ano (MADRUGA et al., 2012). Outro estudo demonstrou que fatores sócio-demográficos como gênero, renda familiar, situação da família e nível escolar contribuem para o aumento do consumo de álcool e que a cerveja é o tipo de bebida preferida entre adolescentes e jovens no Brasil (PINSKY et al., 2010).

1.3 Ação e Efeitos do álcool no sistema nervoso central (SNC)

Os efeitos do álcool no SNC são diretamente proporcionais aos níveis plasmáticos dessa droga que correspondem à quantidade ingerida e velocidade de ingestão.

Após a administração pela via oral ocorre o metabolismo de primeira passagem no estômago de parte desse álcool pela enzima álcool desidrogenase gástrica, sendo o restante absorvido pelo intestino delgado e distribuído amplamente por todos os sistemas fisiológicos (CABALLERÍA, 2003; MATSUMOTO; FUKUI, 2002).

No fígado o álcool é metabolizado em aldeído, um metabólito tóxico, e então a acetato pela ação das enzimas álcool desidrogenase (AD) hepática e aldeído desidrogenase (ALD) hepática que reduzem o cofator NAD^+ a NADH (LIEBER, 1997; SALASPURO et al., 1999).

Há outro mecanismo de oxidação do etanol a aldeído que ocorre através da enzima citocromo P450 2E1 (CYP2E1) pela redução do NAD^+ . Em baixas concentrações plasmáticas de etanol (abaixo de 10 mM) a CYP2E1 é pouco demandada, porém há um aumento de sua atividade decorrente de uma grande ingesta de álcool. Em concentrações plasmáticas em torno de 100 mM a CYP2E1 pode contribuir com 50% do total da metabolização do etanol (MATSUMOTO; FUJIMIYA; FUKUI, 1994). Com o uso crônico de álcool, ocorre um aumento na transcrição da enzima CYP2E1, favorecendo o metabolismo pelo sistema microssômico (BADGER et al., 1993).

Tanto a AD quanto a ALD possuem várias isoformas que apresentam metabolização variada do álcool ou acetaldeído e estão associadas à suscetibilidade dos efeitos desagradáveis e ao risco de desenvolver a dependência (CABALLERÍA, 2003; MATSUMOTO; FUKUI, 2002). Abaixo é mostrado um esquema da metabolização do etanol pelo sistema enzimático (Figura 2).

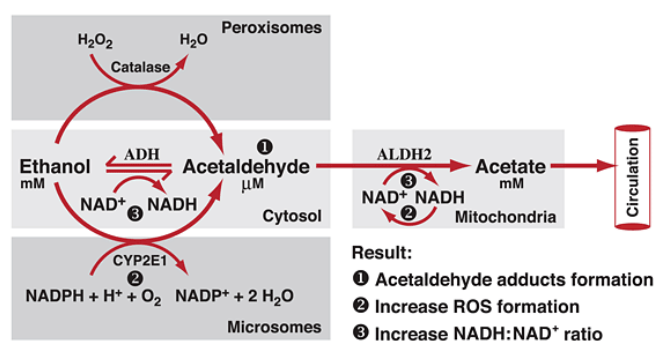


Figura 2 – Sistema enzimático de metabolização do álcool. Fonte: http://mentedesperta.com/wp-content/uploads/2009/10/29_4_pathways.gif

O etanol é uma droga que apresenta baixa potência, pois o início dos seus efeitos ocorre em concentrações plasmáticas a partir de 5 a 10 mM/L (DAVIES et al., 2002). Em concentrações mais baixas o álcool tem efeito semelhante ao de drogas estimulantes pela inibição de sinapses inibitórias, o que gera desinibição, excitação e euforia, podendo culminar com agitação e agressividade. Com a continuidade do uso, apresenta seu efeito depressor: diminuição do equilíbrio, da concentração e aumento do tempo de resposta. Doses mais elevadas levam progressivamente à ataxia, dificuldade na articulação das palavras, prejuízo motor e cognitivo, perda dos sentidos, coma e morte por parada respiratória (POHORECKY; BRICK, 1988).

Tais efeitos ocorrem porque o etanol é capaz de interferir na ação dos principais sistemas de neurotransmissores. Seu efeito inicialmente excitatório e posteriormente depressor está ligado à sua afinidade a receptores GABA_A. Este receptor está presente em mais de 20% dos neurônios cerebrais e é responsável pela inibição sináptica mediada pelo neurotransmissor ácido γ -aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório do SNC (KOOB, 2004).

Posteriormente foi descoberta a interação do etanol com receptores do glutamato, principal neurotransmissor excitatório do SNC (CURTIS; JOHNSTON, 1974), que também participa do efeito ambíguo (excitatório/inibitório) do álcool.

A ação agonista nos receptores opióides indica o provável alvo do reforço positivo do etanol, uma vez que os antagonistas opióides, como a naltrexona, inibem a necessidade de consumo ou reduzem a fissura pelo álcool (ROBERTS et al., 2000). Sua ação estaria mais relacionada aos mecanismos de dependência, fissura e síndrome de abstinência, que também são acompanhados por alterações comportamentais como agitação, agressividade ou depressão (GILPIN; KOOB, 2008).

Em relação ao sistema serotoninérgico, o etanol reduz os níveis de serotonina e também de suas projeções neuronais em embriões de ratas prenhas (SARI; ZHOU, 2004; ZHOU; SARI; POWROZEK, 2005). A exposição pré-natal ao álcool também reduz o número de neurônios 5-HT e essa redução persiste até a fase adulta (SARI; ZHOU, 2004).

Como toda droga com risco de dependência, o álcool afeta o sistema dopaminérgico na via mesolímbica elevando os níveis de dopamina no núcleo accumbens (GILPIN; KOOB, 2008).

1.4 Indução de estresse oxidativo pelo álcool

Um radical livre (RL) é qualquer espécie química capaz de existir de forma independente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados (Halliwell; Gutteridge, 1999). O desemparelhamento de elétrons, situação energeticamente instável, confere alta reatividade a essas espécies. Tal característica permite que a formação de radicais livres, por excelência um processo contínuo e fisiológico, cumpra funções biológicas relevantes durante os processos metabólicos.

As espécies reativas atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas e sua produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de ATP por meio da cadeia transportadora de elétrons; fertilização do óvulo; ativação de genes; e participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção. Porém, a produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SHAMI; MOREIRA, 2004).

Esse tipo de dano foi denominado de estresse oxidativo, que ocorre quando a produção celular de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas do nitrogênio (ERNs) excede a capacidade dos antioxidantes naturais de eliminação dessas moléculas.

EROs

RADICALARES	NÃO RADICALARES
Superóxido, $O_2^{\cdot-}$	Peróxido de hidrogênio, H_2O_2
Hidroxil, $\cdot OH$	Ácido hipocloroso, $HOCl$
Peroxil, RO_2^{\cdot}	Ácido hipobromoso ($HOBr$)
Alcoxil, RO^{\cdot}	Ozônio, O_3
Hidroperoxil, HO_2^{\cdot}	

Tabela 1 – Principais EROs (retirado de ROSSO, 2005).

Dentre as EROs estão os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxil (OH^{\cdot}), peroxil (RO_2^{\cdot}), hidroperoxil (HRO_2^{\cdot}) e, ainda, algumas espécies não-radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As ERNs são representadas por radicais como o óxido nítrico (NO^{\cdot}), o dióxido de nitrogênio ($NO_2^{\cdot-}$), o peroxinitrito ($ONOO^-$) e o óxido nitroso (HNO_2), que contribuem para os mecanismos pró-oxidantes e dano neuronal (HALLIWELL, 2009). Nas figuras 3 e 4 são apresentadas as principais espécies reativas.

ERNs

RADICALARES	NÃO RADICALARES
Monóxido de Nitrogênio, NO^{\cdot}	Ácido nitroso, HNO_2
Dióxido de Nitrogênio, NO_2^{\cdot}	Trióxido de dinitrogênio, N_2O_3
	Dióxido de dinitrogênio N_2O_2
	Íon nitrônio, NO_2^+
	Ânion nitrônio, $NO^{\cdot-}$
	Tetróxido de dinitrogênio, N_2O_4
	Peroxinitrito, $ONOO^{\cdot-}$
	Ácido peroxinitroso, $ONOOH$
	Cloreto de nitrila, NO_2Cl

Tabela 2 – Principais ERNs (retirado de ROSSO, 2005).

As EROs e ERNs são produtos do metabolismo normal do oxigênio e os organismos aeróbios desenvolveram defesas para o controle dessas espécies reativas (HUANG et al., 2000). Tais defesas são constituídas por antioxidantes enzimáticos, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) – Fig. 3 - e não enzimáticos, como a glutathione (GSH) e as vitaminas A, C e E, além de elementos traços como zinco e selênio (JOHANSEN et al., 2005).

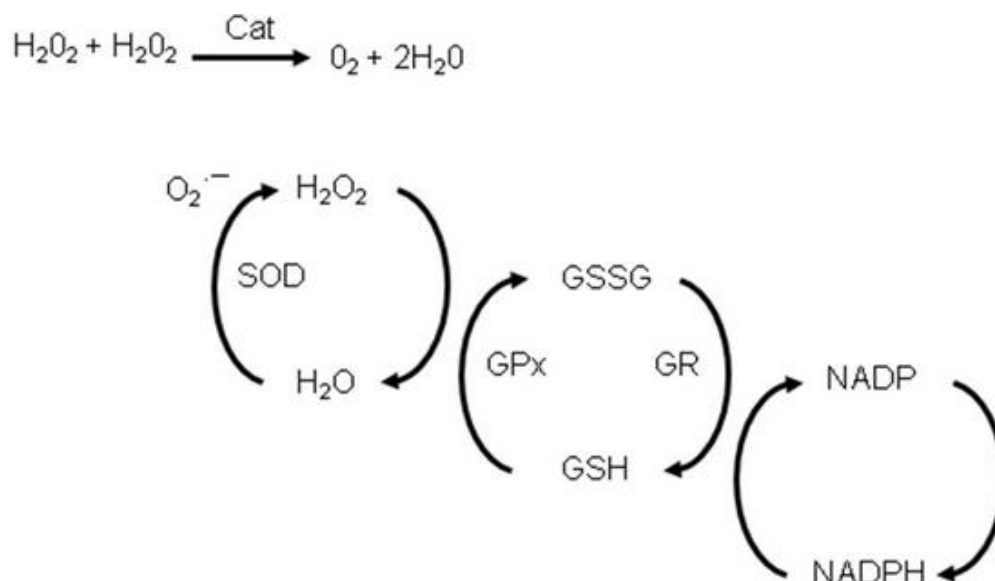


Figura 3 – Sistema antioxidante enzimático.

Durante o estresse oxidativo, espécies reativas podem causar danos em macromoléculas tais como proteínas, lípidos e DNA, causando disfunção e morte celular (DRÖGE, 2002; MATÉS, 2000). Há um crescente corpo de evidências indicando que o estresse oxidativo é o determinante primário de diversas patologias. Os radicais $\text{O}_2^{\cdot-}$ e OH^{\cdot} , por exemplo, estão associados a aumentos dos processos peroxidativos e, quando ligados a baixas concentrações de antioxidantes, estão envolvidos em um grande número de doenças degenerativas (MATÉS, 2000).

Entretanto, a formação de radicais livres e indução de estresse oxidativo tem sido observada também no abuso e dependência de drogas (FINESCHI et al., 2001; GÖNENÇ et al., 2005). Em relação ao álcool, tais efeitos podem ser diretos ou através de seus metabólitos secundários, que promovem acentuada redução nos níveis plasmáticos ou séricos de antioxidantes provenientes da dieta como α -tocoferol, ácido ascórbico e selênio (WARD, 1989).

Outro estudo sugeriu que o metabolismo do etanol está envolvido na formação de EROs e ERNs, bem como na depleção do sistema antioxidante e aumento nos níveis de malondialdeído (DAS; VASUDEVAN, 2007), um importante indicador de peroxidação lipídica.

Em 1994, LECOMTE et al. demonstraram que 417 homens consumidores leves e moderados de álcool possuíam níveis plasmáticos de vitaminas e minerais antioxidantes maiores e níveis menores de malondialdeído quando comparados aos 102 pacientes alcoolistas sem complicações hepáticas.

Já um estudo realizado em 2009 confirmou o prejuízo que o álcool exerce através do estresse oxidativo quando 76 indivíduos alcoolistas possuíam níveis maiores de malondialdeído e diminuição da atividade da SOD em comparação com 19 não bebedores (HUANG et al., 2009).

O SNC é extremamente susceptível aos prejuízos causados pelo excesso de espécies reativas, já que possui alta taxa metabólica, alta concentração de ácidos graxos e metais de transição, vulnerabilidade à peroxidação e susceptibilidade à formação de radicais OH^\cdot (REYNOLDS et al., 2007). Além do mais, o cérebro possui baixas concentrações de antioxidantes e reduzida capacidade de regeneração, o que o torna vulnerável aos prejuízos de substâncias como o etanol (FLOYD, 1999; REYNOLDS et al., 2007).

Muitos mecanismos podem explicar o dano neuronal produzido pelo álcool, com evidências e participação do estresse oxidativo e apoptose (MONTOLIU et al., 1995; RAMACHANDRAN et al., 2003).

O etanol afeta o SNC com alta toxicidade e degeneração (DE LA MONTE et al., 2009), o que pode causar danos cerebrais. Uma vez que haja uma produção excessiva de substâncias reativas do oxigênio, além da moderada capacidade do cérebro de produzir substâncias antioxidantes (SUN; SUN, 2001), ocorrerá formação de EROs e posterior degeneração neuronal em diferentes áreas cerebrais (CARDENAS et al., 2005; DURAZZO et al., 2004; HARPER et al., 2003).

De fato, o uso agudo de álcool aumenta a produção de EROs no cérebro de ratos ou em células cultivadas do hipocampo de roedores (AGAR et al., 2003; GONZÁLEZ; PARIENTE; SALIDO, 2007), bem como induz peroxidação lipídica (MANSOURI et al., 2001a; RENIS et al., 1996; SOMANI et al., 1996a).

O uso crônico de álcool também aumenta a produção de EROs e para alguns autores a indução da enzima CYP2E1 contribui para esse aumento por gerar

metabólitos citotóxicos como $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 (MONTOLIU et al., 1995; NORDMANN; RIBIERE; ROUACH, 1990).

A exposição ao álcool reduz em 25% a atividade antioxidante da SOD em homogenatos de cérebros de ratos (NORDMANN; RIBIERE; ROUACH, 1990) e *in vitro* também reduz a atividade da SOD em neurônios e células gliais de roedores e aves (HALLIWELL, BARRY; GUTTERIDGE, 1999). Além da SOD, o álcool também promove mudanças na atividade da CAT, dependendo da região cerebral avaliada e do tipo de tratamento utilizado, se crônico (CALABRESE et al., 1998) ou agudo (SOMANI et al., 1996b).

O padrão de consumo de álcool em *binge* também é um forte indutor de estresse oxidativo (HAMELINK et al., 2005) e é um importante fator preditivo de dano cerebral, pois indivíduos que adotam essa forma de consumo tornam-se mais vulneráveis aos prejuízos causados pela droga (HUNT, 1993).

O dano neuronal induzido pelo álcool produz alguns dos efeitos mais insidiosos do alcoolismo, incluindo déficits cognitivos na aprendizagem e memória no homem (PFEFFERBAUM et al., 1998; WHITE, 2003). Num modelo animal, o consumo de álcool em *binge* por quatro dias demonstrou que houve desenvolvimento de neurotoxicidade em áreas como o córtex entorrinal e o giro denteado de ratos após o tratamento e que esse efeito foi bloqueado pela administração concomitante de agentes antioxidantes (HAMELINK et al., 2005).

1.5 Neuroinflamação e marcadores inflamatórios.

Inflamação é uma resposta de defesa que ocorre após dano celular causado por microrganismos patogênicos, agentes físicos (radiação, trauma, queimaduras), químicos (toxinas, substâncias cáusticas), necrose tecidual e/ou reações imunológicas (ABBAS; JANEWAY, 2000).

Contudo, enquanto uma resposta inflamatória a um estado infeccioso oferece benefícios claros, uma resposta sustentada ou inapropriada pode causar numerosas doenças, tais como: doença inflamatória do intestino, artrite reumatóide e psoríase. A inflamação também é um importante componente do prejuízo causado por

doenças autoimunes, câncer, diabetes e doenças cardiovasculares. (DALGLEISH; O'BYRNE, 2006; TEDGUI; MALLAT, 2006).

Acreditava-se que o cérebro era um órgão privilegiado imunologicamente e por isso não era susceptível à inflamação ou ativação imunológica. Esse ponto de vista foi revisto nos últimos anos e atualmente é aceito que o cérebro coordena e regula muitos aspectos das respostas de defesa (LUCAS; ROTHWELL; GIBSON, 2006), apenas de uma forma diferenciada. Um dos aspectos mais relevantes é o recrutamento tardio e modesto dos leucócitos, que é substituído por uma intensa e rápida ativação glial (LUCAS; ROTHWELL; GIBSON, 2006).

As células da glia, particularmente micróglia, são responsáveis pelas funções imunológicas no cérebro e desencadeiam a resposta inflamatória. As células microgliais (macrófagos do parênquima cerebral) permanecem em um estado inativo em um cérebro saudável, se comparadas aos macrófagos de outros tecidos. Contudo, são rapidamente estimuladas em resposta à injúria ou infecção. Essa ativação promove mudanças morfológicas que conferem novas funções à micróglia como fagocitose, regulação positiva de moléculas da superfície celular e produção e secreção de mediadores inflamatórios (HANISCH, 2002).

Muitos mediadores inflamatórios têm relativamente baixa atividade no SNC saudável e são expressos em níveis muito baixos ou indetectáveis. Contudo, são induzidos rapidamente após injúria ou infecção (LUCAS; ROTHWELL; GIBSON, 2006).

Dentre esses mediadores destacam-se as citocinas, que são polipeptídeos ou glicopeptídeos extracelulares e hidrossolúveis produzidos pelas células no local da lesão ou por células do sistema imunológico e atuam especialmente por mecanismos parácrino e autócrino (BEAULIEU P, LUSSIER D, 2010; LIN; CALVANO; LOWRY, 2000). Diferentes células podem sintetizar a mesma citocina e uma única citocina pode atuar em várias células com efeitos diferentes em cada uma delas - fenômeno chamado de pleiotropia. Além da pleiotropia, as citocinas possuem outras duas características marcantes que são a redundância (mesmo efeito) e sinergismo (reforço do efeito). Dessa forma, ações semelhantes podem ser desencadeadas por diferentes citocinas que, com frequência, são formadas em cascata, ou seja, uma citocina estimula suas células-alvo a produzir mais citocinas (ZHANG; AN, 2007).

Citocina é um nome genérico para um conjunto de moléculas que incluem as linfocinas (citocinas produzidas por linfócitos); monocinas (produzidas por monócitos); quimiocinas (citocinas com atividade quimiotática) e interleucinas (citocinas produzidas por leucócitos com atividade em outros leucócitos (DINARELLO, 2007).

As citocinas promovem mudanças na atividade, diferenciação, proliferação e sobrevivência da célula imunológica, além de regular a atividade e produção de outras citocinas. Dessa forma, podem desempenhar um papel pró-inflamatório ou anti-inflamatório. As principais citocinas consideradas pró-inflamatórias (resposta Th1) são as interleucinas 1, 2, 6, 7, 12 e o fator de necrose tumoral (TNF). Já as citocinas da resposta Th2 são interleucinas 4, 10, 13, interferon- γ (IFN- γ) e o fator transformador de crescimento β (TGF β) (BEAULIEU P, LUSSIER D, 2010; CURFS; MEIS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997).

Uma vez que sua classificação quanto à célula de origem ou pela função biológica é inviável, as citocinas foram agrupadas em interleucinas (numeradas de IL-1 a IL-35); fatores de necrose tumoral; quimiocinas e fatores de crescimento mesenquimal (BEAULIEU P, LUSSIER D, 2010; RAEBURN et al., 2002).

Diante da grande variedade dos marcadores inflamatórios já estudados, se torna impossível realizar uma abordagem global das citocinas. Dessa forma, esse estudo foi conduzido com foco em cinco delas que estão resumidas na tabela abaixo.

Marcador inflamatório	Receptor	Principais efeitos	Principais células produtoras	Referências
IL-1α e β	IL-1RI e IL-1RII	Pró-inflamatória, ativa a liberação de TNF- α e IL-6, promove a fase aguda da inflamação, pirógeno endógeno.	Monócitos, macrófagos e neutrófilos	(DINARELLO, 1996), (VARELLA; FORTE, 2001), (AREND, 1991; DINARELLO, 1996; VARELLA; FORTE, 2001).
IL-1ra	IL-1RI	Anti-inflamatório, competidor antagonista da IL-1.	Monócitos, macrófagos e neutrófilos	VARELLA; FORTE, 2001).
TNF-α	Superfamília TNF-R	Pró-inflamatória, induz proteínas de choque, IL-1 e apoptose.	Monócitos e macrófagos	(CLARK, 2007), (VARELLA; FORTE, 2001).
IFN-γ	IFN- γ R	Pró-inflamatória, associada a infecções virais, ativação de macrófagos, indução de TNF- α , IL-1, NO e inibição de IL-10.	Th1, NK e células musculares	(PESTKA; KRAUSE; WALTER, 2004), (EL-HASHEMITE et al., 2004; FARRAR; SCHREIBER, 1993).
IL-4	IL-4R	Anti-inflamatória, inibe IL-1, TNF- α e IL-6, induz diferenciação Th0 em Th2, proliferação e diferenciação de linfócitos B.	Th2, mastócitos e basófilos	(BROWN; HURAL, 1997; WANG et al., 1995), (KELSO, 1995; MOSMANN et al., 2005).
IL-10	IL-10R	Anti-inflamatória, inibe IL-1, TNF- α e IL-6, IFN e IL-12.	Treg, Th2 e macrófagos	(BEAULIEU P, LUSSIER D, 2010; LIN; CALVANO; LOWRY, 2000; RAE BURN et al., 2002), (CURFS; MEIS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997; ZHANG; AN, 2007).

Tabela 3 – Resumo dos marcadores inflamatórios avaliados nesse estudo.

1.6 Neuroinflamação induzida pelo consumo de álcool.

Uma possível explicação para os prejuízos causados no cérebro pelo consumo de álcool é que seu consumo gera neuroinflamação. Isso ocorreria pela ativação de células gliais e estimulação de vias de sinalização intracelular que desencadeiam a liberação e síntese de citocinas pró-inflamatórias, ativação da ciclooxigenase-2 (COX-2), indução da óxido nítrico sintase (iNOS) e morte de células neurais (BLANCO et al., 2005; VALLÉS et al., 2004).

Dessa forma, a ativação microglial induzida pelo álcool pode desencadear a produção de componentes tóxicos como EROs e NO (BLANCO et al., 2004). Citocinas inflamatórias, assim como o que ocorre com o glutamato, podem contribuir para injúria cerebral similarmente como a que ocorre em distúrbios e doenças degenerativas (GIOVANNINI et al., 2003; HIRSCH; HUNOT; HARTMANN, 2005; OWENS, 2003).

1.7 BDNF e o álcool.

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) foi descoberto em 1982 (BARDE; EDGAR; THOENEN, 1982), 30 anos após a descoberta da primeira neurotrofina – o fator de crescimento neuronal (NGF) (LEVI-MONTALCINI; HAMBURGER, 1951). A partir desse ponto, mais quatro neurotrofinas foram descobertas: neurotrofina 3 (NT-3) em 1990, neurotrofina 4/5 (NT-4/5) em 1991, neurotrofina 6 (NT-6) em 1994 e neurotrofina 7 (NT-7) em 1998 (LESSMANN; GOTTMANN; MALCANGIO, 2003).

O BDNF é a principal neurotrofina do cérebro, sendo produzida pela glia e pelos núcleos neuronais. O BDNF possui grande expressão no hipocampo, neocórtex, corpo amígdaloide e cerebelo (SHIMIZU et al., 2003).

As principais funções do BDNF estão relacionadas ao crescimento, sobrevivência e diferenciação neuronal, além de atuar nos processos de aprendizagem, memória e plasticidade sináptica (CHAO, 2003; GHITZA et al., 2010). O BDNF desempenha suas funções através da ligação ao receptor de alta afinidade tirosina quinase B (TrkB), específico para BDNF, e o receptor de neurotrofina de baixa afinidade p75, que reconhece outras neurotrofinas.

Após a formação do complexo BDNF-TrkB ocorre dimerização desses complexos, o que leva a auto-fosforilação e recrutamento de proteínas de ancoragem intracelular. Isso desencadeia a ativação de vias de sinalização distintas como: via da MAPK/ERK, a via PLC e a via PI3K (REICHARDT, 2006). A sinalização via MAPK pode levar a ativação de CREB, que é capaz de regular BDNF e TrkB (FINKBEINER et al., 1997; MOONAT et al., 2010). Já a ligação com o receptor p75 modula processos ligados à morte celular e apoptose (CHAO, 2003).

Como o BDNF possui muitas funções tróficas no SNC e participa do processo de plasticidade neural, muitos estudos associaram a influência da degeneração induzida pelo álcool em sua atividade e expressão juntamente com o receptor TrkB.

Alguns estudos em animais indicam que não há mudanças nos níveis de mRNA do TrkB, com o consumo de etanol no hipocampo (MILLER et al., 2002; ZHANG et al., 2000); outros demonstram regulação positiva desses receptores *in vivo* durante o período de abstinência ao etanol no córtex e hipocampo (BAEK; HEATON; WALKER, 1996; TAPIA-ARANCIBIA et al., 2001). Ainda, não houve alteração nos

níveis de BDNF em hipocampo de ratos após o uso crônico de álcool (MILLER et al., 2002; OKAMOTO et al., 2006), enquanto que em outros estudos não demonstraram alteração dos níveis de BDNF após o uso crônico de álcool (MACLENNAN; LEE; WALKER, 1995; TAPIA-ARANCIBIA et al., 2001). No entanto, alguns estudos apontam para um aumento de BDNF após a exposição ao álcool no núcleo accumbens e estriado (KERNS et al., 2005; MCGOUGH et al., 2004).

1.8 Hipocampo

A região hipocampal se localiza na porção medial do lobo temporal e é uma das regiões que compõem o sistema límbico, que está envolvido em processos relacionados à emoção, aprendizado e memória.

A região hipocampal consiste da formação hipocampal e da região parahipocampal. A formação hipocampal é uma estrutura em forma de C e inclui o giro denteado, corno de Ammon ou hipocampo propriamente dito (dividido em CA1, CA2, CA3 e CA4) e o subículo. A região parahipocampal consiste do pré-subículo, córtex entorrinal, córtex peririnal e córtex pós-rinal (VAN STRIEN et al., 2009). Tem sido demonstrado que o hipocampo é uma estrutura importante para a consolidação da memória de curto e longo prazo (IZQUIERDO et al., 1998a) e diferentes áreas corticais aferentes e eferentes interagem com o hipocampo para regular a aquisição e o armazenamento de novas informações (IZQUIERDO; MEDINA, 1998b).

1.9 CPF

O CPF tem sido associado a diversos processos emocionais, cognitivos e atencionais (VERTES, 2006). O CPF aumenta em volume conforme o desenvolvimento filogenético se aproxima da espécie humana. Cálculos baseados na citoarquitetura da estrutura mostram que o CPF corresponde a 3,5 % do total do córtex em gatos, 7 % em cachorros, 11,5 % em macacos, 17 % em chimpanzés e 29 % em humanos. A grande magnitude relativa do CPF de humanos presumidamente indica que o córtex é o substrato para funções cognitivas de ordem superior (FUSTER, 2008).

Em ratos, o CPF recebe projeções de áreas corticais sensoriais, bem como motoras e límbicas (UYLINGS; VAN EDEN, 1990) e pode ser dissociado em CPF medial, lateral e ventral (DALLEY; CARDINAL; ROBBINS, 2004). O CPF medial é composto por uma secção dorsal com as regiões dos córtices cingulado anterior, pré-central e pré-límbico dorsal e uma secção ventral com as regiões dos córtices pré-límbico ventral, infralímbico, peduncular dorsal e medial orbital (GEORGE; KOOB, 2010).

Já o CPF lateral é composto pelo córtex orbitofrontal e pelos córtices dorsal e ventral anterior. O CPF ventral é composto pelos córtices ventral orbital e orbital ventrolateral (GEORGE; KOOB, 2010).

O CPF é uma área de associação terciária, não recebendo as aferências sensoriais diretamente da periferia, mas processando as informações sensoriais através de suas conexões com outras regiões corticais e subcorticais (BARBAS, 2000). É uma das regiões que apresenta o sistema mais rico de conexões de todo o neocórtex, recebendo aferências do tronco cerebral, hipotálamo, sistema límbico (hipocampo e amígdala), núcleos da base, através dos núcleos de retransmissão do tálamo, tálamo (especialmente núcleos anterior e dorsomedial), além de outras áreas do neocórtex, especialmente áreas de associação (FUSTER, 1999).

Dessa forma, o CPF está envolvido em processos mentais relacionados à aquisição de conhecimento e compreensão, incluindo lembrança, julgamento, concentração e solução de problemas, que são funções de elevada complexidade que abrangem a linguagem, a imaginação, a percepção, a aprendizagem, o raciocínio e o planejamento (FUSTER, 2001; WOOD; GRAFMAN, 2003, NAKAMURA-PALACIOS, 2011).

Além disso, o CPF, tanto em primatas quanto em ratos, também possui amplas conexões com os córtices pré-motor, somatossensorial, auditivo, visual, olfatório, gustatório e límbico, estando envolvido, portanto, em diferentes funções e aspectos do comportamento (UYLINGS; VAN EDEN, 1990).

Um fato importante é que o CPF é uma área maturação tardia (HUTTENLOCHER; DABHOLKAR, 1997). O amadurecimento cortical ocorre em sentido caudal-rostral, da porção medial para a lateral. Deste modo o CPF é a última estrutura a se desenvolver, chegando à maturação completa por volta dos 30 anos no homem (SOWELL et al., 1999). Além do mais, sua porção medial é parte integrante do

circuito de gratificação cerebral, fortemente implicado nos processos neurais subjacentes à dependência de drogas (GARDNER, 2005).

Esses fatores são muito importantes no abuso de drogas, principalmente entre jovens e adolescentes, pois alterações nessa área os tornam extremamente suscetíveis a interferências no desenvolvimento das estruturas cerebrais e das funções cognitivas (THOMPSON et al., 2004; WHITE, 2003). Ainda, tende a prejudicar principalmente o processo de tomada de decisões, levando o indivíduo a escolher opções mais atraentes em relação aos ganhos imediatos (como o próprio ato de beber), em detrimento de um comportamento voltado para a análise das consequências futuras de suas ações (BECHARA et al., 2001).

1.10 Sistema (endo)canabinóide

Cultivada há mais de cinco mil anos, a planta do gênero *Cannabis* foi utilizada na produção de cordas e fitas usadas na confecção de tecidos. Desde 2600 a.C., nas antigas civilizações orientais, a planta era consumida com o intuito de tratar câimbras, dores reumáticas, dores menstruais e outras doenças inflamatórias (TIBIRIÇA, 2010; ZUARDI, 2006). Embora conhecida há milhares de anos, a caracterização química do principal princípio ativo da *Cannabis*, o Δ^9 tetrahydrocannabinol (THC), foi descrito somente na década de 1960 (DI MARZO et al., 2001; FRANCISCHETTI; DE ABREU, 2006).



Figura 4 – Utilização da planta *Cannabis* durante a história.

Os ligantes canabinóides, incluindo o THC, exercem seus efeitos ao ativar receptores celulares do tipo canabinóides (CB), que são classificados em dois tipos: CB₁ e CB₂ (DEVANE et al., 1992), receptores esses que estão acoplados a proteína G e pertencem a uma grande e diversificada família de proteínas acopladas à membrana. A sua ativação modula a adenil-ciclase, canais de cálcio e potássio e fatores de transcrição (FRANCISCHETTI; DE ABREU, 2006; PAN; YOO; HO, 2011). O receptor CB₁ é basicamente expresso no SNC e em órgãos periféricos como fígado, músculo, pâncreas, tecido adiposo, coração, pulmão, próstata, útero, ovário, testículo, timo e medula óssea (GUINDON; HOHMANN, 2009; MOTAGHEDI; MCGRAW, 2008).

Já o receptor CB₂ está abundantemente expresso em células do sistema imunológico e hematopoiético, células da micróglia e em baixos níveis nos neurônios do tronco encefálico (CABRAL et al., 2008). O CB₂ apresenta uma atividade imunomoduladora muito significativa. Inúmeros relatos indicam que a ativação de CB₂ resulta em analgesia, pois suprimem a resposta aguda de dor em alguns modelos de experimentação animal. Os níveis de receptores CB₂ podem aumentar em determinadas condições e patologias, o que o torna ainda mais atrativo como um possível alvo terapêutico (ATWOOD; MACKIE, 2010).

Tal descoberta despertou o interesse na procura por ligantes endógenos, fato ocorrido em meados dos anos 1990 com a descoberta de um sistema de sinalização em que canabinóides endógenos agem como lipídeos de sinalização e desempenham papéis regulatórios e na homeostase (PACHER; BÁTKAI; KUNOS, 2006; PERTWEE, 2008).

Os endocanabinóides são, portanto, substâncias endógenas capazes de se ligar e ativar pelo menos um dos dois receptores canabinóides (DI MARZO, 1998). Os dois principais ligantes são anandamida (N-araquidonoil etanolamina - AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG), que são compostos formados principalmente a partir da hidrólise de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, especificamente o ácido araquidônico.

A AEA e o 2-AG são formados por vias dependentes de fosfolipídios, sendo sintetizados, respectivamente, pelas enzimas N-acilfosfatidiletanolamida-fosfolipase D seletiva (NAPE-PLD) e a sn-1-diacylglicerol lipase seletiva (DAG Lipase) e devido

sua natureza lipofílica, não são armazenados em vesículas, mas sintetizados e liberados “sob demanda” em resposta a uma série de estímulos (MARCO et al., 2009; PIOMELLI, 2003).

A inativação de cada um dos principais endocanabinóides no SNC é em princípio por uma hidrolase específica e relativamente bem caracterizada, que gera o ácido graxo poliinsaturado de grande importância biológica, o ácido araquidônico (AA) (HWANG et al., 2010). Assim, os endocanabinóides são inativados por recaptação celular e posterior clivagem enzimática: AEA é metabolizada pela hidrolase amida de ácido graxo (FAAH) e o 2-AG é catalisado principalmente pela lipase monoacilglicerol (MAGL) (AHN; MCKINNEY; CRAVATT, 2008). Essa eficiente inativação catalítica ajuda a garantir que eles ajam localmente, próximos ao seu sítio de ação (HWANG et al., 2010).

O neuromodulador do tipo endocanabinóide é clivado na membrana pós-sináptica e atua no neurônio pré-sináptico, por isso são denominados sinalizadores retrógrados na regulação sináptica (WILSON; KUNOS; NICOLL, 2001).

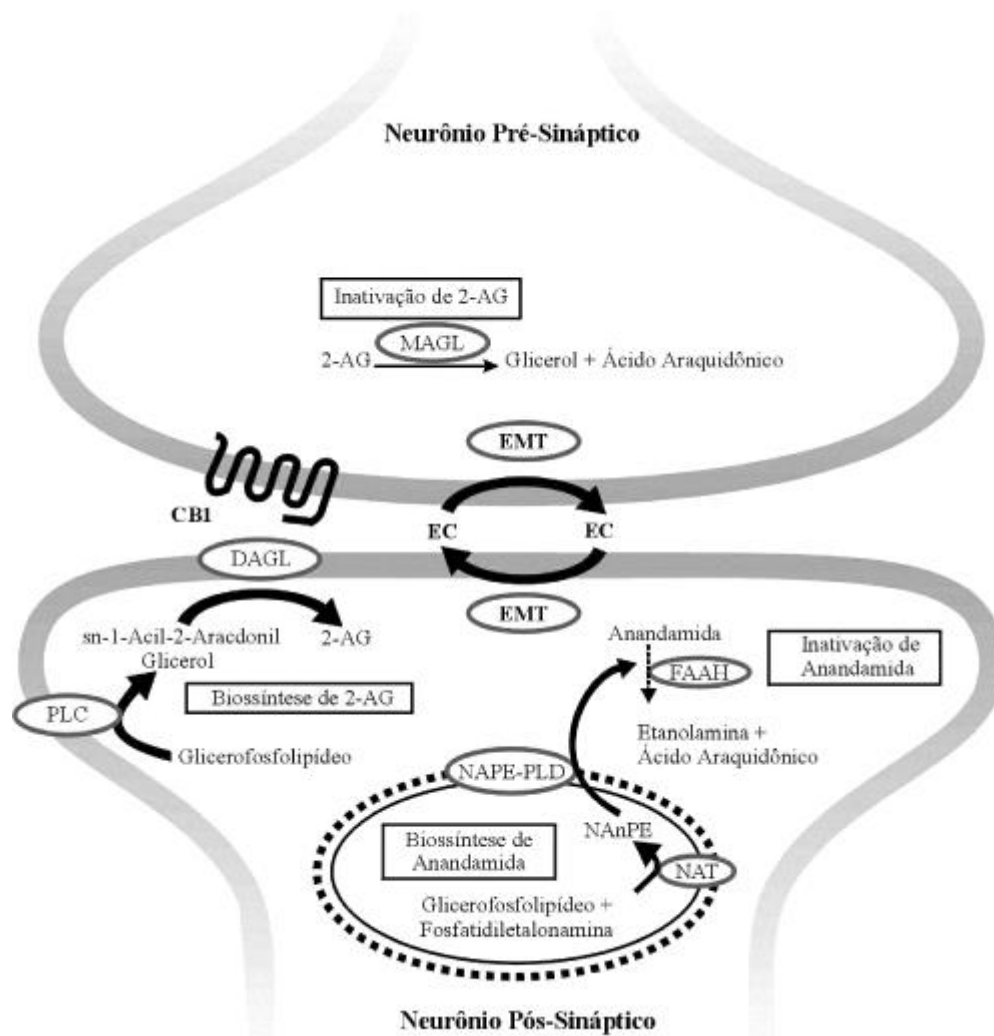


Figura 5 – Síntese e sinalização do sistema endocanabinóide (Retirado de GODOY-MATOS et al., 2006).

Essa sinalização retrógrada em receptores CB_1 pré-sinápticos suprime transitoriamente a liberação de neurotransmissores. Assim, os endocanabinóides estão envolvidos em uma série de fenômenos de plasticidade sináptica (EDWARDS; ZHANG; ALGER, 2008). De fato, a AEA parece ter um papel importante em plasticidade neuronal, memória e proteção contra injúria neuronal. Daí, inibidores seletivos da FAAH são um alvo primário como drogas potenciais para importantes condições clínicas, tais como estados psicocomportamentais (depressão, ansiedade), eventos excitotóxicos e doenças neurodegenerativas como: Doença de Huntington, Alzheimer e Parkinson (CENTONZE et al., 2007; SCHERMA et al., 2008).

já no caso do receptor CB₂, seu papel sobre a modulação de respostas neuroinflamatórias tem sido extensamente investigado, pois este receptor pode alterar o curso da resposta inata e adaptativa contra patógenos, regulando negativamente a ativação de monócitos e micróglia, além de evidências apontarem para a expressão deste receptor em células do SNC em condições inflamatórias (CABRAL; GRIFFIN-THOMAS, 2009; KLEIN et al., 2003).

Desse modo, um possível efeito neuroprotetor, aqui testado pelo inibidor da FAAH URB597, contra a indução de estresse oxidativo e na neuroinflamação causados pelo consumo de álcool em *binge* se torna extremamente relevante, principalmente em animais adolescentes, cujo CPF ainda está em pleno desenvolvimento, e que possui conexões importantes com o hipocampo, também envolvido em processos cognitivos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do inibidor da FAAH URB597 na neurotoxicidade causada pelo consumo de álcool em *binge* agudo e crônico por ratos adolescentes.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar os efeitos da administração prévia do inibidor da FAAH URB597 sobre os efeitos do consumo de diferentes doses de álcool em um esquema de *binge* agudo e crônico na indução de estresse oxidativo no CPF de ratos adolescentes.
- Investigar os efeitos da administração prévia do inibidor da FAAH URB597 sobre os efeitos do consumo de diferentes doses de álcool em um esquema de *binge* agudo e crônico nos níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias e neurotrofina BDNF no CPF e hipocampo de ratos adolescentes.
- Investigar os efeitos da administração prévia do inibidor da FAAH URB597 sobre os efeitos do consumo de diferentes doses de álcool em um esquema de *binge* agudo e crônico na memória de reconhecimento de novos objetos de ratos adolescentes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os animais utilizados no estudo foram ratos Wistar machos, com aproximadamente 30 dias de idade, pesando entre 100 e 120 g, cedidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Por todo o período de tratamento, os animais foram mantidos em gaiolas, sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e um ciclo claro-escuro de 12 horas e acesso à água e à ração *ad libitum*.

O manuseio, cuidado e experimentos feitos nesses animais experimentais seguiram de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais estabelecidos pelo The Guide for Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 2011) and the “EC Directive 86/609/EEC”. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES- CEUA 015/2011).

3.2 Reagentes

Etanol (ETOH, Dinâmica Química Contemporânea, SP, Brasil), 99.5% foi diluído em água destilada (AD) nas concentrações de 10 ou 20% (p/v), para as doses de 3 e 6g/kg respectivamente para administração intragástrica (IG) por gavagem. Como solução controle foi utilizada AD. O URB597 (3'-(aminocarbonyl)[1,1'-biphenyl]-3-yl)-ciclohexylcarbamate (Cayman Chemicals Company, MI, USA) foi estocado em -20°C e diluído no dia da administração numa solução veículo (VEI) composta por tampão fosfato salina:dimetilsulfóxido (2:1) pH 7.5 para a dose de 0,3mg/kg. Esta dose foi baseada no perfil farmacológico da substância (PIOMELLI et al., 2006). A administração de URB foi realizada pela via intraperitoneal (IP). Como solução controle foi utilizada solução VEI.

3.3 Desenho experimental

Para avaliação dos prejuízos causados pelo álcool em *binge* os animais experimentais foram divididos em 2 grandes grupos: *Binge* Agudo e *Binge* Crônico, que foram subdivididos em 3 subgrupos: Controle (que recebeu administração de

VEI pela via IP seguido, 40 minutos (min) depois, de AD pela via IG), 3g/kg (que recebeu VEI IP seguido, 40 min depois, de solução de EtOH 10% p/v) e 6g/kg (que recebeu VEI seguido, depois de 40 min, de solução de EtOH 20% p/v). O tratamento do grupo *Binge* Agudo durou 3 dias consecutivos e o grupo *Binge* Crônico durou 3 dias consecutivos ao longo de 4 semanas.

Já para avaliação dos efeitos do inibidor da FAAH URB597 os animais foram divididos nos mesmos protocolos agudo e crônico de tratamento com etanol em *binge* (URB597 + *Binge* Agudo e URB597 + *Binge* Crônico). Porém, com uma administração prévia do URB597 na dose de 0,3mg/kg diluído em VEI na concentração de 250µg/ml por via IP 40 minutos antes da administração de AD IG ou EtOH IG nas doses de 3 e 6 g/kg. Todas as administrações tiveram os volumes ajustados ao peso de cada animal.

3.4 Concentração de álcool no sangue

Para a determinação da concentração sanguínea de etanol, os animais foram decaptados uma hora após uma única administração IG do etanol e sangue coletado foi analisado em equipamento de cromatografia gasosa com detector de ionização em chama – 450 GC. As análises foram realizadas em colaboração com o Departamento Médico Legal da Superintendência de Polícia Técnico-Científica do estado do Espírito Santo.

3.5 Avaliação de estresse oxidativo – Ensaio do Dihidroetídeo

Para avaliação do estresse oxidativo tecidual *in situ*, os animais foram anestesiados com Ketamina (75 mg/kg) e Xilasina (10 mg/kg) 24 horas após a última administração de drogas e foram submetidos a perfusão intracardiaca com solução nutritora de Krebs-Hepes pH 7,4 a pressão de 100mmHg. O cérebro de cada animal foi removido para realização de cortes histológicos do CPF na espessura de 14 µm em micrótomo criostato (CM1850, Leica, Nussloch, Alemanha).

Os cortes foram incubados em câmara úmida a 37° C por 30 minutos com o corante fluorescente dihidroetidina (DHE, 2 µM) em solução de Krebs-Hepes pH 7,4. Essa substância atua como um marcador fluorescente do ânion superóxido e de outras

EROs, que oxidam o DHE em etídio, que é um composto vermelho e fluorescente (ZHAO et al., 2003). A intensidade de fluorescência é proporcional ao estresse oxidativo tecidual e foi quantificada em fotomicrografias, capturadas com microscópio Leica DM 2500 equipado com filtro A4 de 528 nm e câmera Leica DFC310FX, e analisadas com o auxílio do programa Image Pro Plus 4.5.

3.6 Quantificação dos níveis de BDNF e citocinas

Foram dissecados hipocampo e CPF dos animais, 24 horas após a última administração das drogas. Essas estruturas foram, então, devidamente acondicionadas e estocadas a -80°C . Os tecidos foram homogeneizados em tampão para extração de citocinas contendo inibidores de proteases (NaCl 0,4M, Tween20 0,05%, BSA 0,5%, PMSF 0,1 mM, cloreto de benzetônio 0,1 mM, EDTA 10mM e aprotinina 20KI (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Após a maceração do tecido utilizando o Ultraturax em tampão de extração de citocinas (800 μL para o CPF e 500 μL para o hipocampo), os homogenatos foram centrifugados (10000rpm a 4°C por 10 minutos) e o sobrenadante coletado e armazenado em freezer -80°C até o momento do ensaio.

As amostras foram então descongeladas para avaliação dos níveis de citocinas (IL-1 β , TNF- α , IFN-gama, IL-4 e IL-10) e fator neurotrófico BDNF pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) sanduíche, utilizando-se kits R&D Systems.

Brevemente, a cada poço da placa de ELISA foram adicionados 100 μL de solução contendo anticorpo monoclonal contra a citocina ou proteína de interesse diluídos em solução de PBS (anticorpo de captura). As placas foram incubadas por, pelo menos, 12 horas a 4°C . Os anticorpos não aderidos nas placas foram descartados por inversão e lavagem em PBS–Tween 0,1%. Em seguida, bloqueou-se as placas com uma solução contendo albumina de soro bovino (BSA) 1%, durante 2 horas à temperatura ambiente (200 μL /poço). Após nova lavagem das placas (PBS–Tween 0,1%), em cada poço foi adicionado 50 μL da amostra ou 100 μL da proteína padrão. As placas foram novamente incubadas por pelo menos 12 horas a 4°C e em seguida lavadas (PBS–Tween 0,1%). Após a lavagem, incubou-se as placas com anticorpos

conjugados com biotina e diluídos em BSA 0,1%, por duas horas à temperatura ambiente.

Em seguida, após nova lavagem (PBS–Tween 0,1%), acrescentou-se 100 µL/poço de estreptavidina conjugada com peroxidase às placas, que foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, após nova lavagem (PBS–Tween 0,1%), adicionou-se o cromógeno Ø-fenileno-diamina (OPD) às placas, na ausência de luz. A reação foi interrompida com solução contendo ácido sulfúrico 1M. A leitura da intensidade da reação foi realizada em espectrofotômetro de placa no λ de 490 nM utilizando o software SOFTmax Pro – versão 2.2.1.

As proteínas totais das amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) e o resultado expresso em pg de citocinas/mg de proteínas. Todo o procedimento e análise foram realizados no Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica LIIM- Faculdade de Medicina/UFMG.

3.7 Tarefa de reconhecimento de objetos

O paradigma experimental utilizado neste estudo foi o teste de reconhecimento de novos objetos (TRO) seguindo o modelo adaptado de (ENNACEUR; DELACOUR, 1988). A caixa foi confeccionada em acrílico transparente, nas medidas de 600mmX600mmX450mm, recoberta com papel branco nas laterais e preenchida com maravalha (Fig. 6).

Esse teste é muito utilizado para avaliar a capacidade de memorizar e reconhecer objetos novos. No primeiro dia, antes de qualquer procedimento, considerado o dia da habituação, o animal foi colocado na caixa, sem nenhum objeto, para que se habituassem ao ambiente, por 10 minutos.

Após 24 horas, na sessão treino, o animal foi recolocado na caixa, com dois objetos exatamente iguais (A1 e A1), equidistantes na caixa, a 15 cm das paredes laterais, e deixado por 5 minutos para que explorasse o ambiente livremente. O tempo de exploração de cada objeto foi registrado no programa Any-maze, para posterior análise através do índice de reconhecimento.

No mesmo dia 1,5 horas após a sessão treino, foi avaliada a memória de curta duração (STM), onde o animal foi recolocado na caixa, com dois objetos A1 e B1, de material semelhante (plástico), porém de formas diferentes, e deixado por um tempo de 5 minutos para explorar o ambiente.

Para testar a memória de longa duração (LTM) o animal foi recolocado na caixa, 24 horas após a sessão treino, com dois objetos (A1 e C1), e o animal teve 5 minutos para explorar o novo ambiente (IZQUIERDO et al., 1998).

Neste protocolo a habituação foi realizada no último dia de administração de drogas, porém no horário da manhã (as administrações de drogas sempre eram realizadas no período da tarde). A sessão treino (pré-teste) e a avaliação da memória de curto prazo foram realizadas 24 h após a última administração de drogas, e a avaliação da memória de longo prazo 48 h após a última administração de drogas.

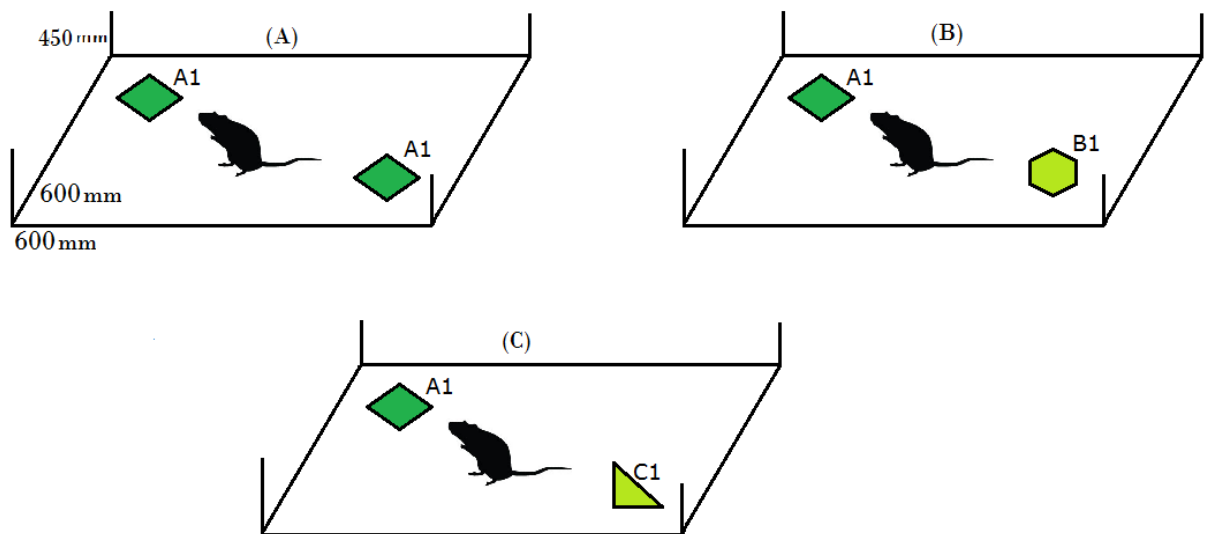


Figura 6 – Demonstração da aplicação do pré-teste em que os objetos eram semelhantes descritos na figura como A1; (B) demonstração da aplicação do teste de Memória de Curto prazo, em que A1 aparece como objeto conhecido e B1 como objeto novo; (C) demonstração da aplicação do teste de Memória de Longo prazo, em que A1 representa o objeto conhecido e C1 o segundo objeto novo. Todas as demonstrações em questão tiveram duração de 300 segundos de exposição e monitoramento.

3.8 Análise Estatística

Os dados foram apresentados pela média \pm e.p.m. Para a análise da concentração de álcool no sangue foi utilizado o teste t de Student. Para as análises de indução de estresse oxidativo, níveis de BDNF, de citocinas e da tarefa de reconhecimento de objetos foi utilizada análise de variância (ANOVA) de 2 vias seguida de post-hoc LSD. Para todas as análises foi empregado um nível de significância para $P < 0,05$.

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa SPSS 17.0 e para as representações gráficas foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.0.

4 RESULTADOS

4.1 Concentração de álcool no sangue

Na determinação da concentração sanguínea de álcool foi encontrada uma diferença significativa entre as doses 3g/kg e 6g/kg [$T(8) = 3,378$, $p = 0,0048$] (Fig. 7).

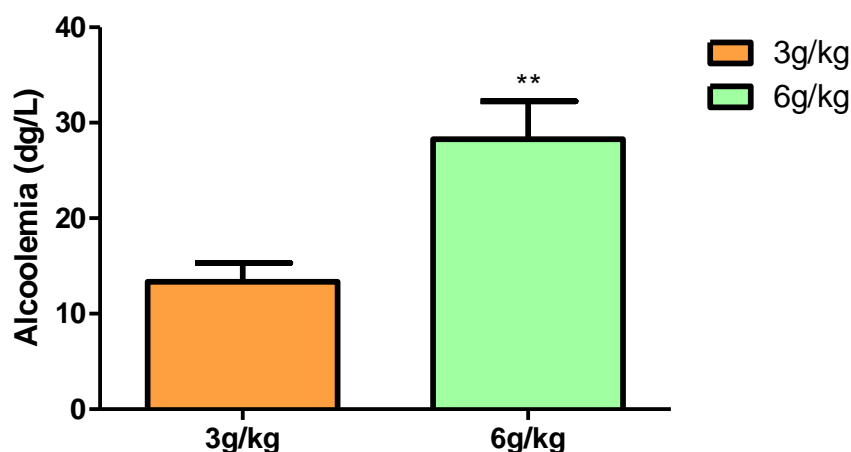


Figura 7 – Comparação do teor alcoólico no sangue dos animais após uma única exposição às doses de 3g/kg ($n = 5$) e 6g/kg ($n = 5$). Considerar (**) $P < 0,01$.

4.2 Determinação do estresse oxidativo pelo ensaio do dihidroetídeo (DHE)

Para a análise do estresse oxidativo pela técnica do DHE os resultados apresentaram diferenças estatisticamente significantes para o modelo de *binge* agudo de álcool entre os grupos (tratados ou não com o URB) [$F(1,29) = 9,187$, $p = 0,005$], e essa diferença foi observada nas doses de álcool 3g/kg, $p = 0,013$ e álcool 6g/kg, $p = 0,002$. Foi observada também uma diferença intragrupo (entre as doses de álcool) [$F(2,29) = 3,411$, $p = 0,047$] e entre o veículo e álcool 3g/kg, $p = 0,003$ e entre as doses veículo e álcool 6g/kg, $p = 0,001$. O estudo ainda demonstrou uma interação entre as drogas URB597 e álcool [$F(2,29) = 4,825$, $p = 0,016$] (Fig. 8 e 9).

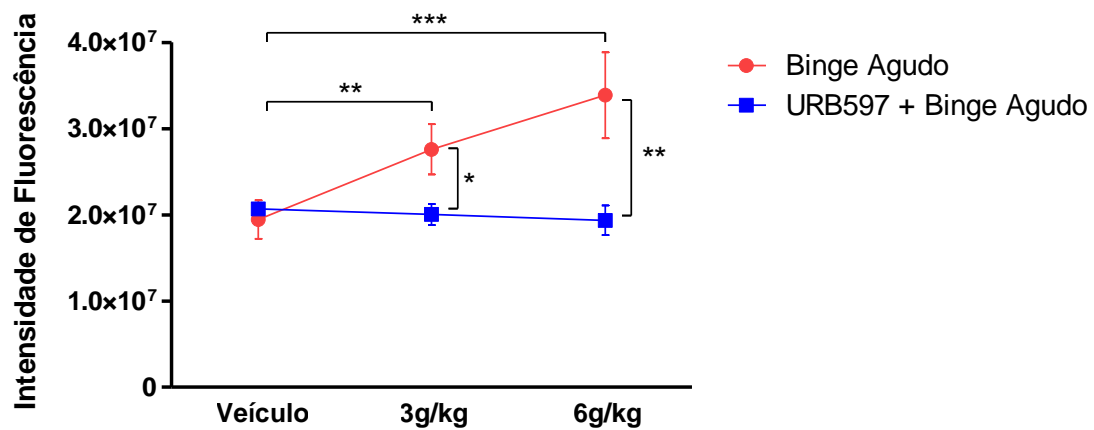


Figura 8 – Comparação do estresse oxidativo pela técnica do DHE entre os grupos *Binge* Agudo e URB597+ *Binge* Agudo. Considerar (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

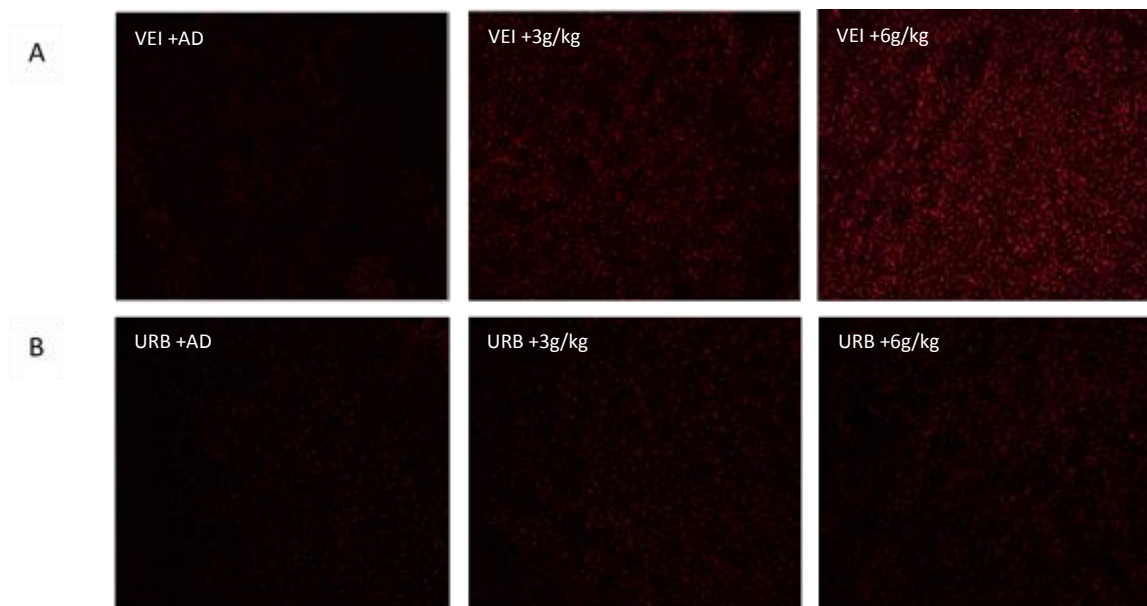


Figura 9 – Comparação entre os grupos *Binge* Agudo (A) e *Binge* Agudo + URB597 (B) utilizando DHE para a expressão de EROs em secções longitudinais de tecido cerebral (CPF), magnificação em 10x.

Já para o tratamento com álcool em *binge* crônico houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos (tratados ou não tratados com URB597) [$F(1,29) = 5,247$, $p = 0,029$], e essa diferença foi observada na dose de álcool 6g/kg $p = 0,000004$. Há também uma diferença estatisticamente significativa intragrupo (para o grupo *Binge* Crônico) [$F(2,29) = 4,403$, $p = 0,021$], observada entre as doses veículo e álcool 6g/kg, $p = 0,012$ e álcool 3g/kg e álcool 6 g/kg, $p = 0,018$. O estudo

ainda demonstrou uma interação entre as drogas URB e álcool [$F(2,29) = 9,616$, $p = 0,001$]. Ver Fig.10 e 11.

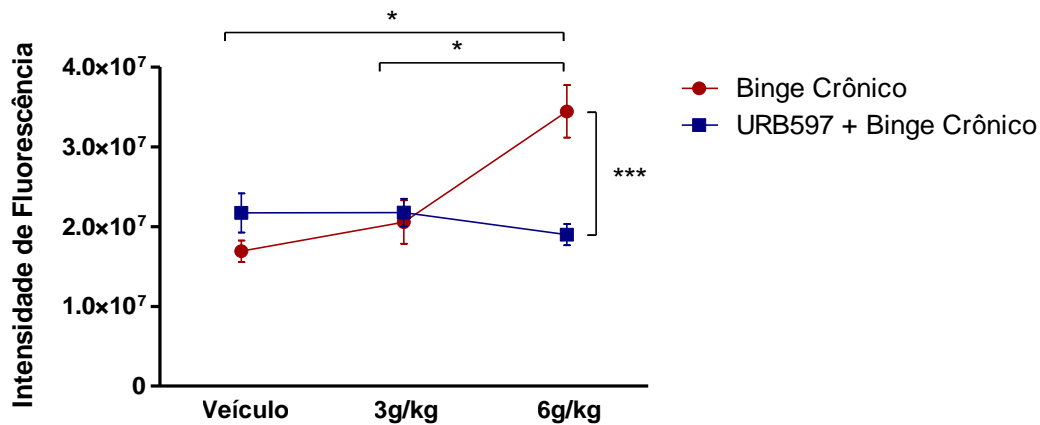


Figura 10 – Comparação do estresse oxidativo pela técnica do DHE entre os grupos *Binge* Crônico e URB597 + *Binge* Crônico. Considerar (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

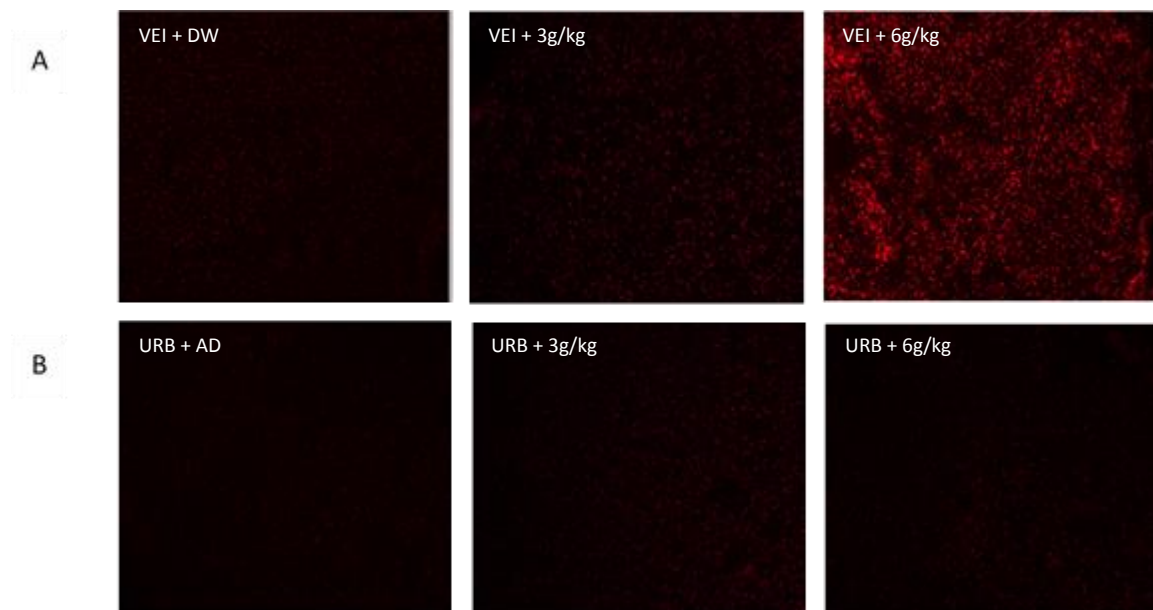


Figura 11 – Comparação entre os grupos *Binge* Crônico (A) e *Binge* Crônico + URB597 (B) utilizando DHE para a expressão de ROS em seções longitudinais de tecido cerebral (CPF), magnificação em 10x.

4.3 Quantificação do BDNF e citocinas

Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de BDNF entre os grupos *Binge* Agudo e URB597 + *Binge* Agudo no CPF (Fig. 12) e hipocampo (Fig. 13).

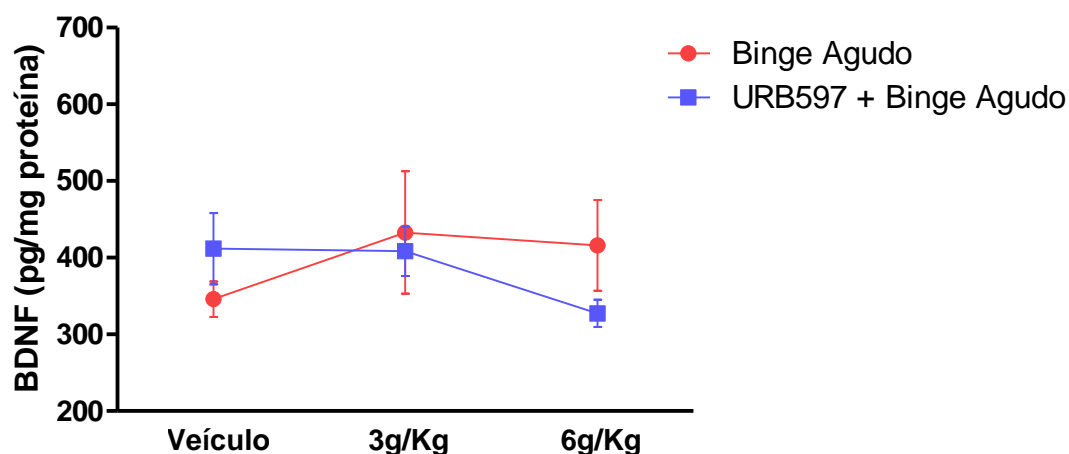


Figura 12 – Comparação dos níveis de BDNF no CPF entre os grupos *Binge Agudo* e URB597 + *Binge Agudo*. Não foram encontradas diferenças significantes.

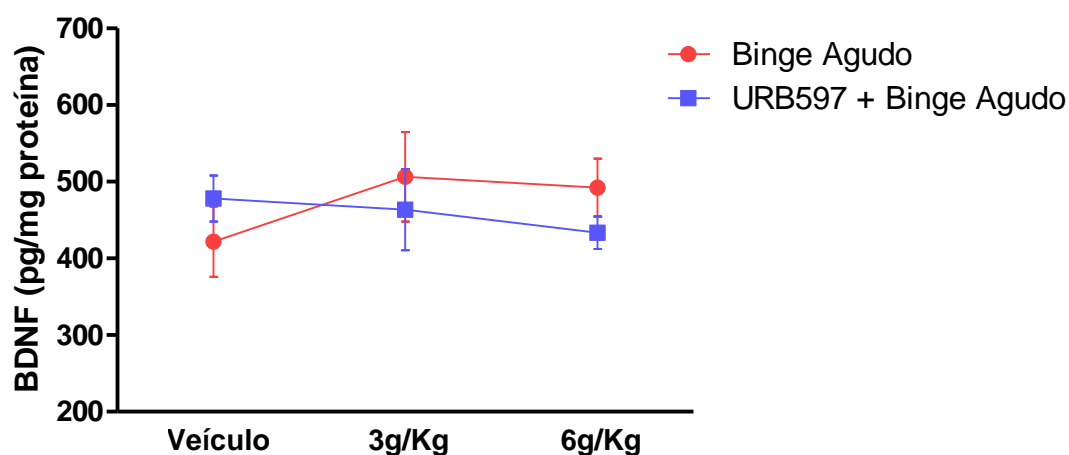


Figura 13 – Comparação dos níveis de BDNF no hipocampo entre os grupos *Binge Agudo* e URB597 + *Binge Agudo*. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes.

Por outro lado, quando comparados os grupos crônicos no CPF (*Binge Crônico* e URB597 + *Binge Crônico*) existe diferença entre grupos [$F(1,27) = 31,289$, $p = 0,000006$] nas doses de álcool 3g/kg, $p = 0,000029$ e álcool 6g/kg, $p = 0,0002$. Existe também uma diferença intragrupo (*Binge Crônico*) [$F(2,27) = 4,905$, $p = 0,015$] entre as doses veículo e álcool 3g/kg, $p = 0,00019$ e entre as doses veículo e álcool 6g/kg, $p = 0,00038$. O estudo ainda demonstrou uma interação entre as drogas URB597 e álcool [$F(2,27) = 7,785$, $p = 0,0021$] (Fig. 14).

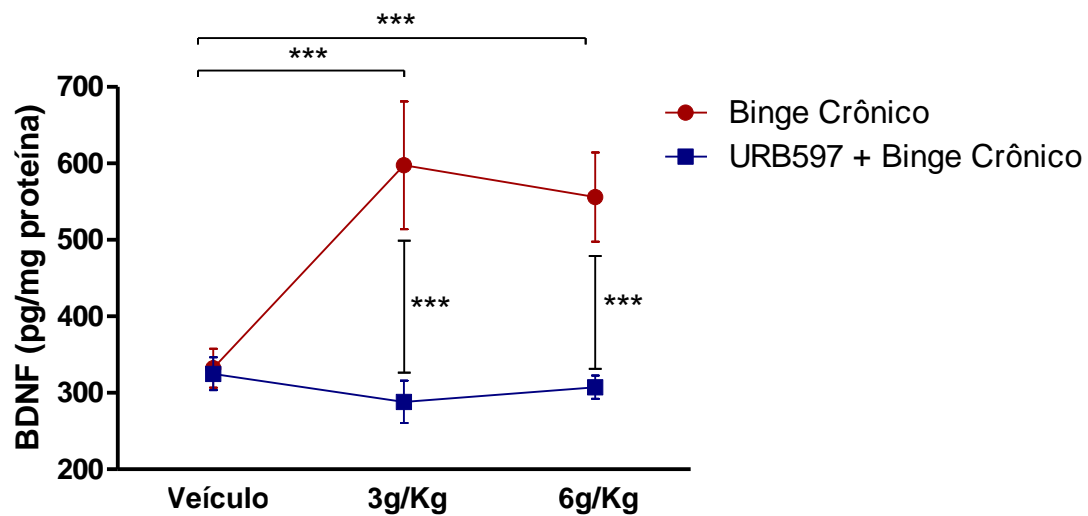


Figura 14 – Comparação dos níveis de BDNF no CPF entre os grupos *Binge Crônico* e URB597 + *Binge Crônico*. Considerar (***) $p < 0,001$.

Efeito semelhante foi encontrado para o hipocampo na comparação entre os grupos *Binge Crônico* e URB597 + *Binge Crônico*. Existe diferença entre os grupos [$F(1,27) = 15,337$, $p = 0,001$] nas doses álcool 3g/kg, $p = 0,002$ e álcool 6g/kg, $p = 0,0055$. Há também a diferença intra grupo (*Binge Crônico*) entre as doses veículo e álcool 3g/kg, $p = 0,045$ e entre as doses veículo e álcool 6g/kg, $p = 0,014$. Há ainda uma interação entre as drogas URB e álcool [$F(2,27) = 3,476$, $p = 0,045$] (Fig. 15).

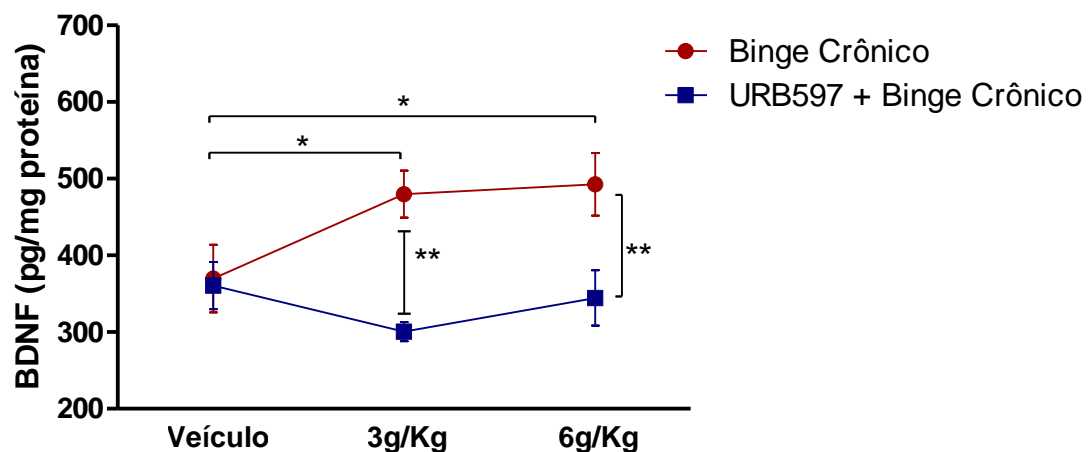


Figura 15 – Comparação dos níveis de BDNF no hipocampo entre os grupos *Binge Crônico* e URB597 + *Binge Crônico*. Considerar (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Os resultados do marcador celular IFN- γ não demonstraram diferença entre os grupos tratados ou não com URB597 no modelo de *binge* agudo [$F(1,30) = 2,649$, $p = 0,114$]. Há diferença estatística dentro do grupo URB 597 + *Binge* Agudo [$F(2,30) = 6,106$, $p = 0,006$] entre as doses veículo e álcool 6g/kg, $p = 0,003$ e álcool 3g/kg e 6g/kg, $p = 0,0001$. Há ainda uma interação entre as drogas URB597 e álcool [$F(2,30) = 4,530$, $p = 0,019$] (Fig. 16).

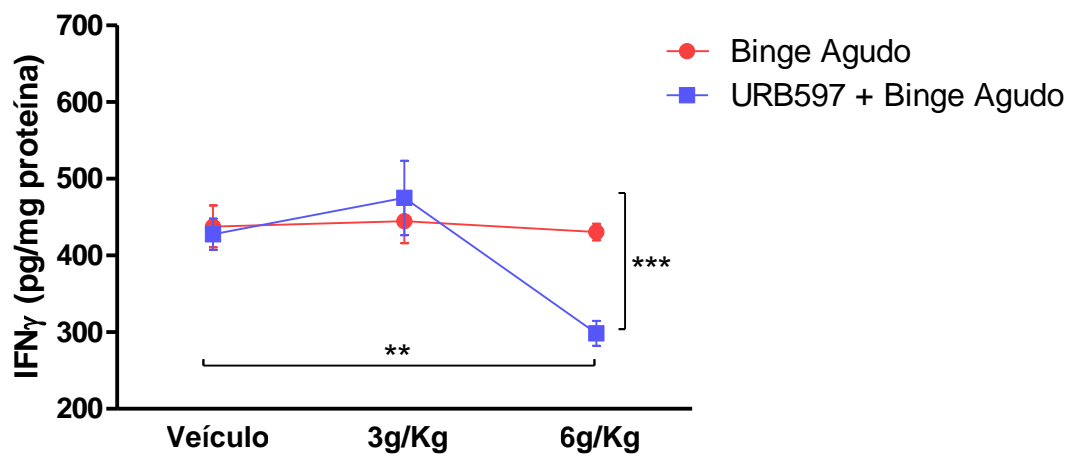


Figura 16 – Comparação dos níveis de IFN- γ no CPF entre os grupos *Binge* Agudo e URB597 + *Binge* Agudo. Considerar (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Para o hipocampo, quando comparados os tratamentos no modelo de *Binge* agudo, ocorre diferença estatisticamente significativa [$F(1,30) = 5,997$, $p = 0,020$] na dose álcool 6g/kg, $p = 0,021$ (Fig. 17).

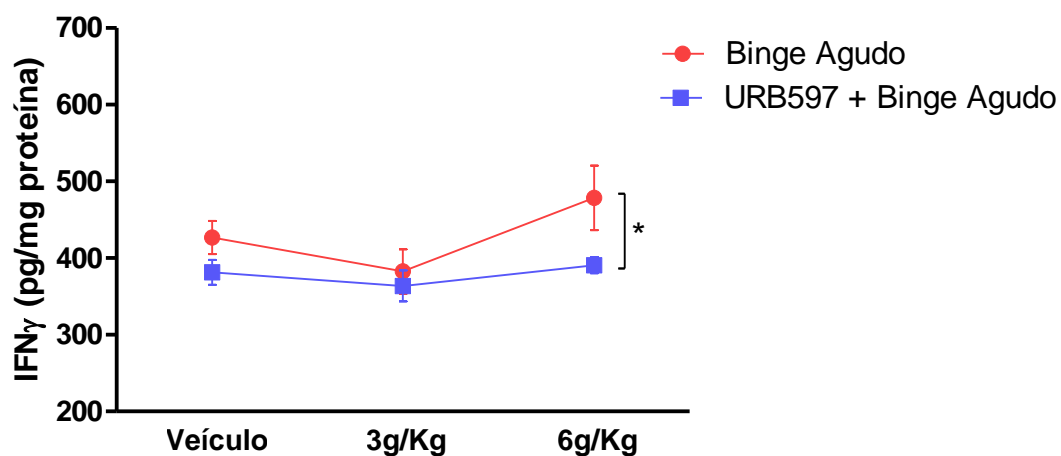


Figura 17 – Comparação dos níveis de IFN- γ no hipocampo entre os grupos *Binge* Agudo e URB597 + *Binge* Agudo. Considerar (*) $p < 0,05$.

Já na comparação do grupo do álcool em *binge* crônico foi observada significância estatística entre os grupos no CPF [F (1,27) = 45,791, $p = 0,00000028$] nas doses álcool 3g/kg, $p = 0,0000082$ e álcool 6g/kg, $p = 0,00000023$. Há também uma diferença intragrupo (URB597 + *Binge* Crônico) [F (2,27) = 13,563, $p = 0,000083$] entre as doses veículo e álcool 3g/kg, $p = 0,0000047$ e entre as doses veículo e álcool 6g/kg, $p = 0,00000034$. Há ainda uma interação entre as substâncias URB597 e álcool [F (2,27) = 18,513, $p = 0,0000089$] (Fig. 18).

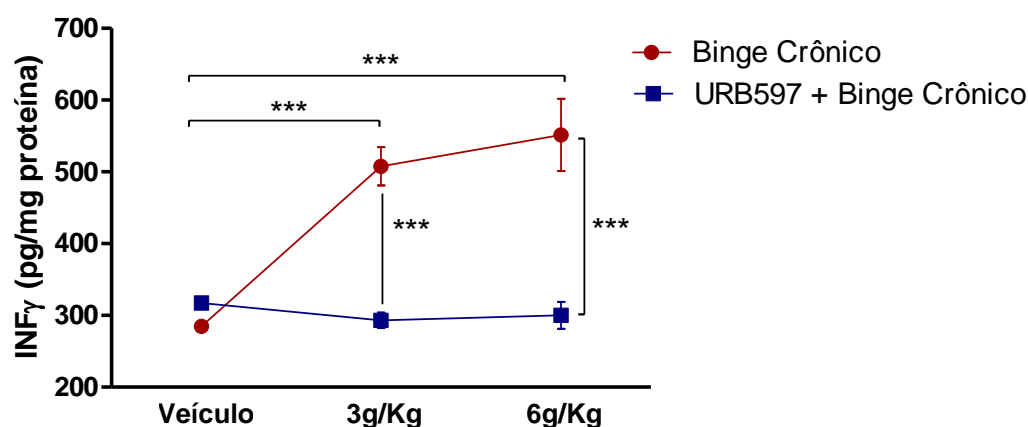


Figura 18 – Comparação dos níveis de IFN- γ no CPF entre os grupos *Binge* Crônico e URB597 + *Binge* Crônico. Considerar (***) $p < 0,001$.

No hipocampo também houve diferença entre os grupos [F (1,27) = 28,194, $p = 0,00013$] nas doses álcool 3g/kg, $p = 0,003$ e 6g/kg, $p = 0,000014$. Ocorre também diferenças intragrupo, no grupo *Binge* Crônico [F (2,27) = 7,323, $p = 0,003$] entre as doses veículo e álcool 3g/kg, $p = 0,004$ e veículo e álcool 6g/kg, $p = 0,0000016$. Há ainda uma interação entre as drogas URB e álcool [F (2,27) = 6,246, $p = 0,006$] (Fig. 19).

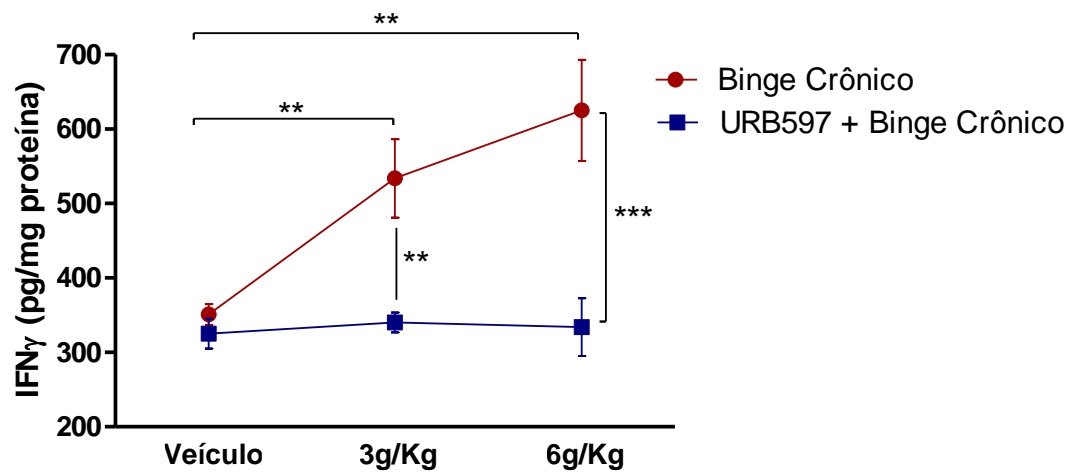


Figura 19 – Comparação dos níveis de IFN- γ no hipocampo entre os grupos *Binge Crônico* e URB597 + *Binge Crônico*. Considerar (**) p < 0,01; (***) p < 0,001.

Nas dosagens de TNF- α não foram encontradas diferenças entre os grupos *Binge Agudo* e URB597 + *Binge Agudo* no CPF e hipocampo (Fig. 20 e 21).

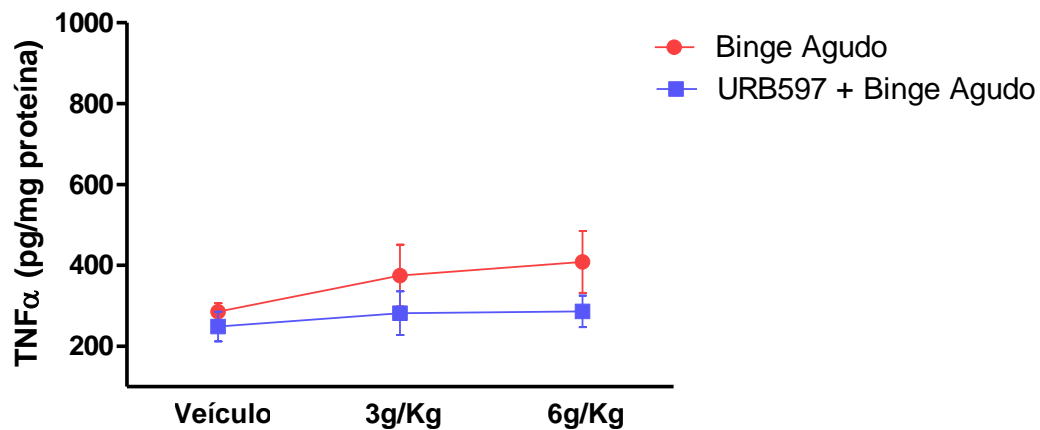


Figura 20 – Comparação dos níveis de TNF- α no CPF entre os grupos *Binge Agudo* e URB597 + *Binge Agudo*.

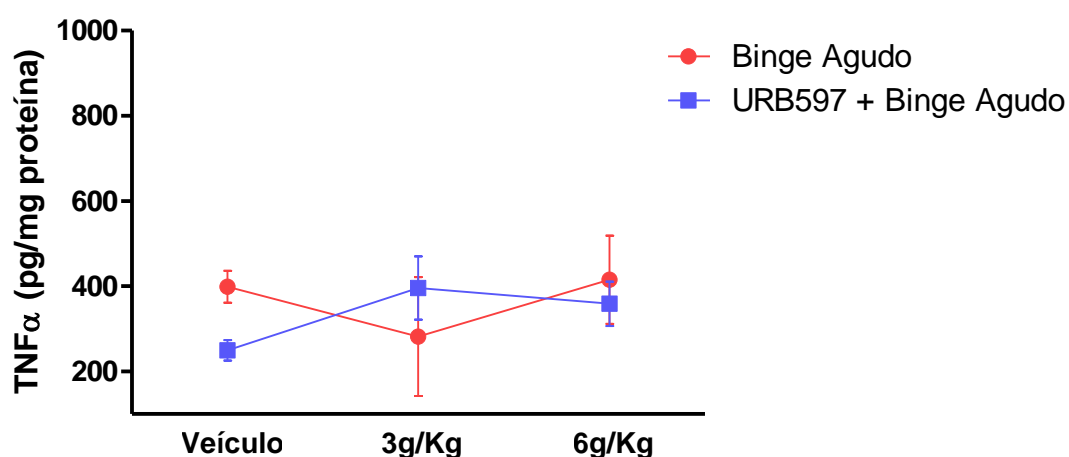


Figura 21 – Comparação dos níveis de TNF- α no hipocampo entre os grupos *Binge Agudo* e URB597 + *Binge Agudo*.

De forma diferente, foi encontrada significância entre os grupos *Binge Crônico* e URB597 + *Binge Crônico* no CPF [F (1,27) = 49,514, $p = 0,0000014$] nas doses álcool 3g/kg, $p = 0,0000067$ e álcool 6g/kg, $p = 0,0000021$. Também foram encontradas diferenças dentro do grupo *Binge Crônico* para as doses de álcool [F (2,27) = 11,956, $p = 0,00019$] entre as doses veículo e álcool 3g/kg, $p = ,000022$ e entre as doses veículo e álcool 6g/kg, $p = ,000001$. Houve ainda uma interação entre o URB597 e álcool [F (2,27) = 10,939, $p = 0,00033$] (Fig. 22).

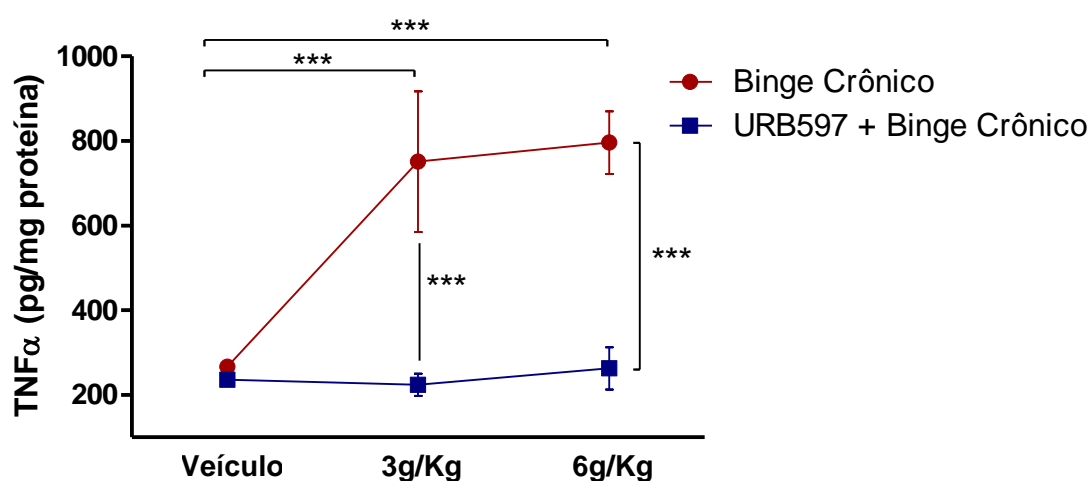


Figura 22 – Comparação dos níveis de TNF- α no CPF entre os grupos *Binge Crônico* e URB597 + *Binge Crônico*. Considerar (***) $p < 0,001$.

No hipocampo também foi encontrada uma significância estatística entre os grupos do tratamento crônico [$F(1,24) = 28,461$, $p = 0,000017$] nas doses 3g/kg, $p = 0,0001$ e 6g/kg, $p = 0,00005$. Houve também significância estatística entre as doses do grupo *Binge* Crônico [$F(2,24) = 7,707$, $p = 0,002$] entre as doses veículo e álcool 3g/kg, $p = 0,00009$ e entre veículo e 6g/kg, $p = 0,00002$. Há ainda uma interação entre as drogas URB e álcool [$F(2,24) = 10,484$, $p = 0,00053$] (Fig. 23).

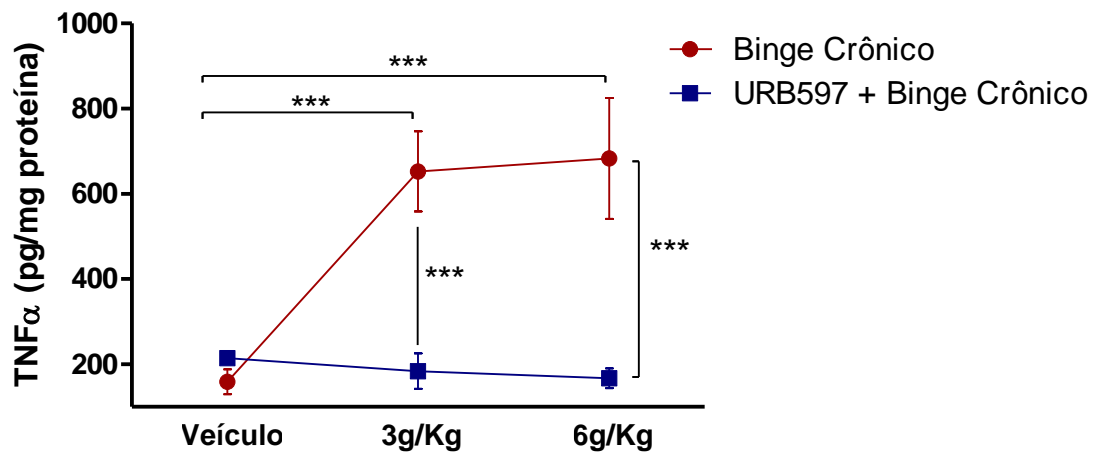


Figura 23 – Comparação dos níveis de TNF- α no hipocampo entre os grupos *Binge* Crônico e URB597 + *Binge* Crônico. Considerar (***) $p < 0,001$.

Para as dosagens de IL-4 não foram encontradas diferenças entre os tratamentos *Binge* Agudo e URB597 + *Binge* Agudo no CPF e Hipocampo (Fig. 24 e 25).

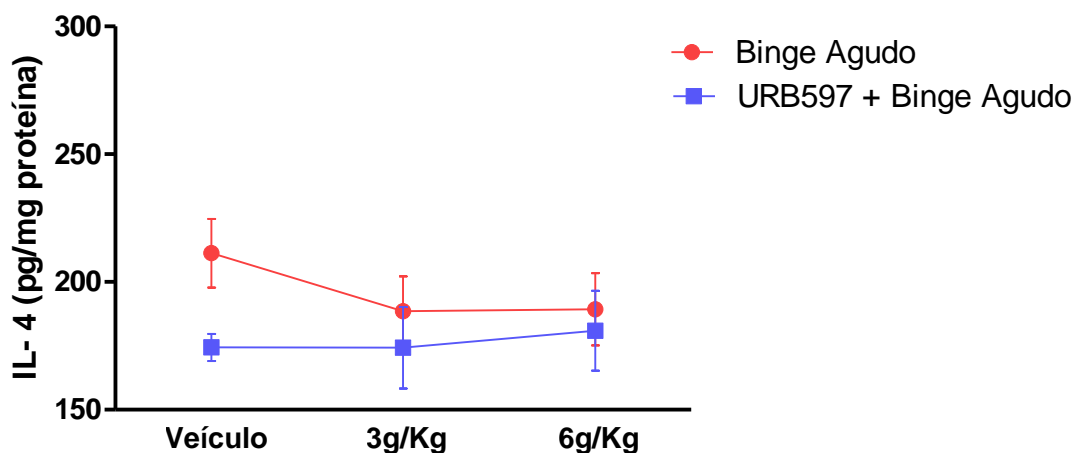


Figura 24 – Comparação dos níveis de IL-4 no CPF entre os grupos *Binge* Agudo e URB597 + *Binge* Agudo.

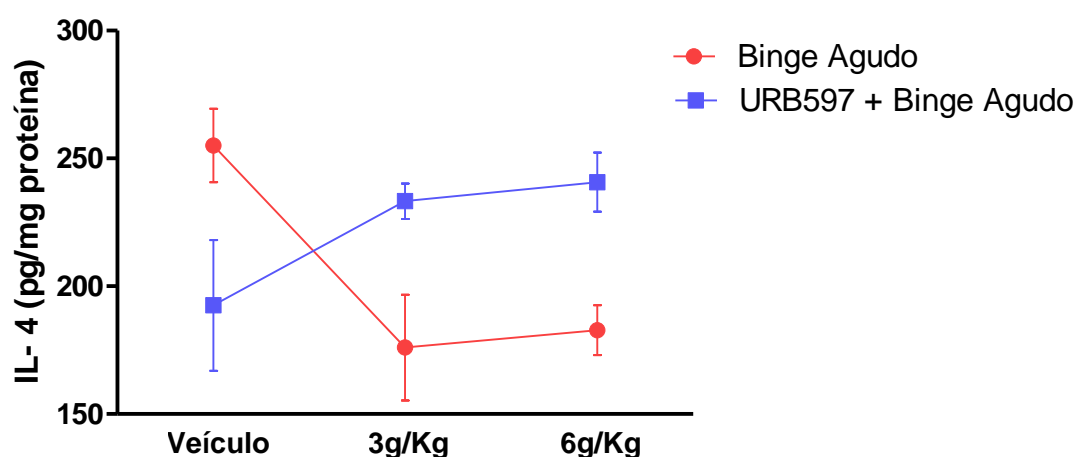


Figura 25 – Comparação dos níveis de IL-4 no hipocampo entre os grupos *Binge Agudo* e URB597 + *Binge Agudo*.

No entanto, no tratamento crônico foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos na região do CPF [F (1,27) = 9,910, $p = 0,004$] nas doses de álcool 3g/kg, $p = 0,002$ e álcool 6g/kg, $p = 0,014$. Há ainda uma interação entre as drogas URB e álcool [F (2,24) = 10,484, $p = 0,00053$] (Fig. 26).

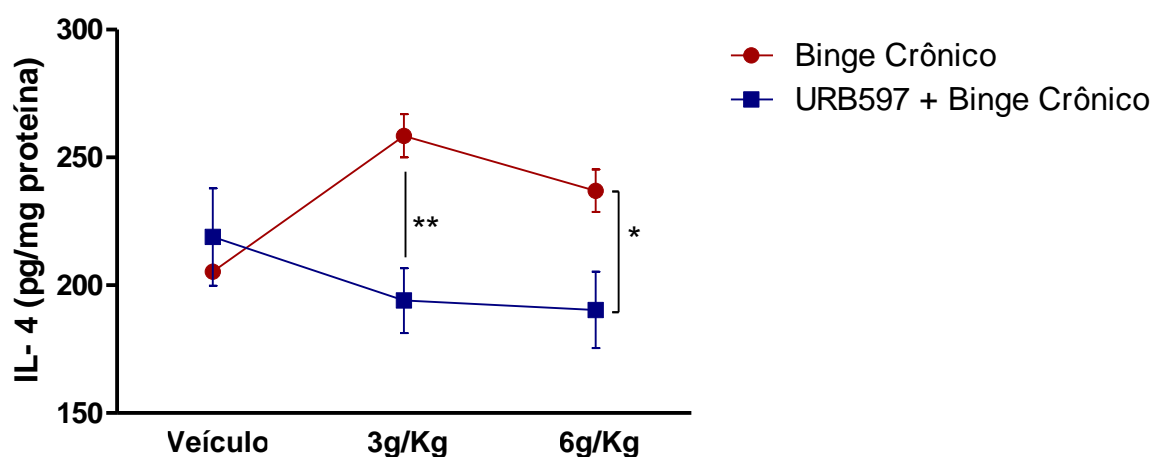


Figura 26 – Comparação dos níveis de IL-4 no CPF entre os grupos *Binge Crônico* e URB597 + *Binge Crônico*. Considerar (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

No hipocampo não houve diferença entre os grupos *Binge Crônico* e URB597 + *Binge Crônico* (Fig. 27).

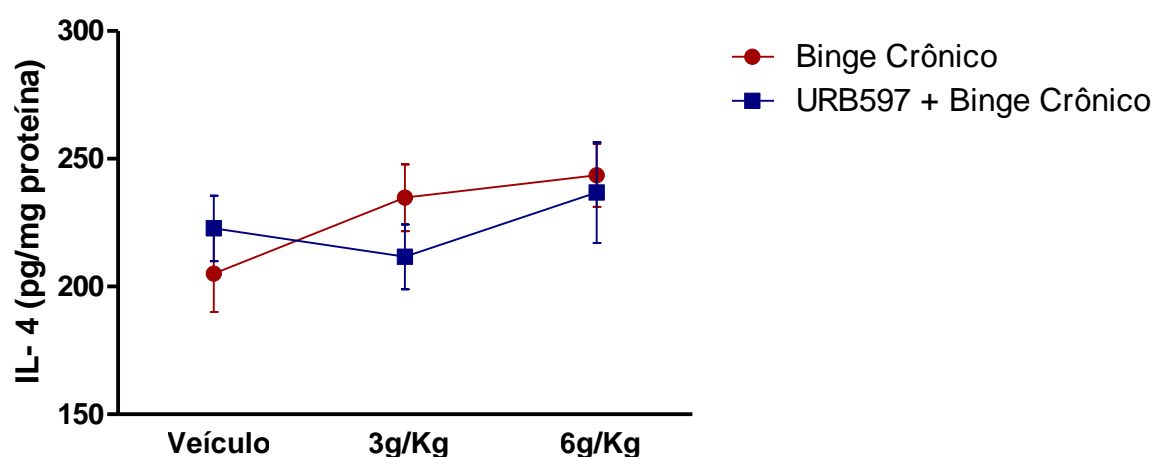


Figura 27 – Comparação dos níveis de IL-4 no hipocampo entre os grupos *Binge Crônico* e URB597 + *Binge Crônico*.

A outra interleucina de resposta Th2, IL-10, também não apresentou alterações em seus níveis na comparação entre os grupos *Binge Agudo* e URB597 + *Binge Agudo* na região do CPF, mas apresentou alteração de sua resposta dentro do grupo URB597 + *Binge Agudo* [$F(2,30) = 7,605$, $p = 0,002$] entre as doses veículo e álcool 6g/kg, $p = 0,002$ e entre as doses álcool 3g/kg e 6g/kg, $p = 0,00003$ (Fig. 28).

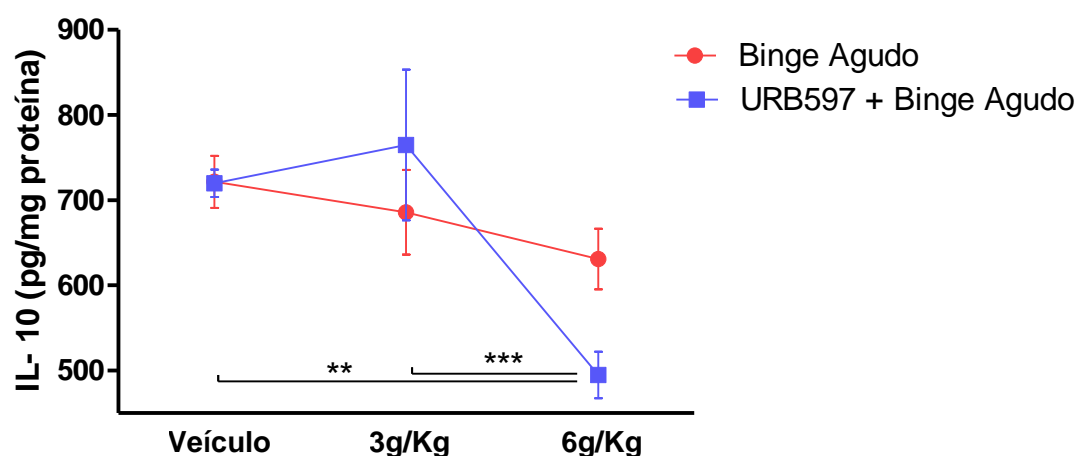


Figura 28 – Comparação da dosagem de IL-10 no CPF entre os grupos *Binge Agudo* e URB597 + *Binge Agudo*. Considerar (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

No hipocampo o perfil da IL-10 também não foi alterado nos modelos de *Binge Agudo* e URB597 + *Binge Agudo* + (Fig. 29).

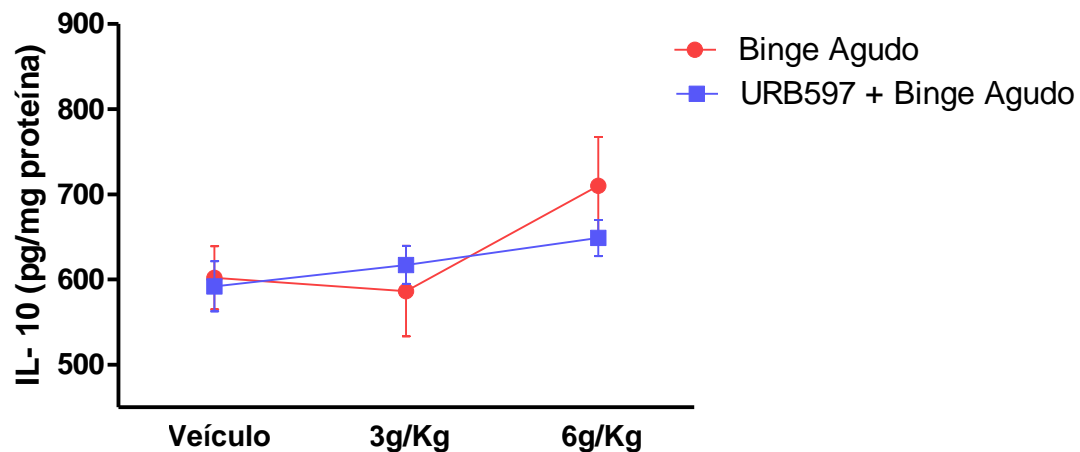


Figura 29 – Comparação dos níveis de IL-10 no hipocampo entre os grupos *Binge Agudo* e URB597 + *Binge Agudo*.

De forma diferente, foi encontrada significância entre os grupos *Binge Crônico* URB597 + e *Binge Crônico* no CPF [F (1,27) = 64,604, $p = 0,00000001$] nas doses álcool 3g/kg, $p = 0,000000017$; álcool 6g/kg, $p = 0,00015$. Existe também diferença estatística intragrupo (*Binge Crônico*) [F (2,27) = 5,602, $p = 0,009$] entre as doses veículo e álcool 3g/kg, $p = 0,000005$; veículo e álcool 6g/kg, $p = 0,02$; álcool 3g/kg e álcool 6g/kg, $p = 0,002$. Há ainda uma interação entre as drogas URB597 e álcool [F (2,27) = 12,742, $p = 0,00012$] (Fig. 30).

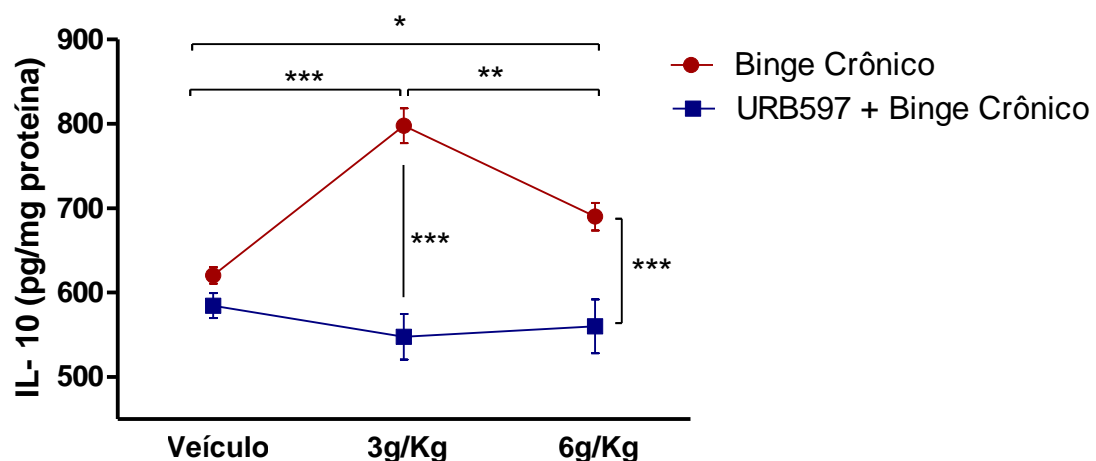


Figura 30 – Comparação dos níveis de IL-10 no CPF entre os grupos *Binge Crônico* e URB597 + *Binge Crônico*. Considerar (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

No hipocampo o perfil da IL-10 não foi alterado nos modelos de *Binge* Crônico e URB597 + *Binge* Crônico, da mesma forma que o tratamento agudo (Fig. 31).

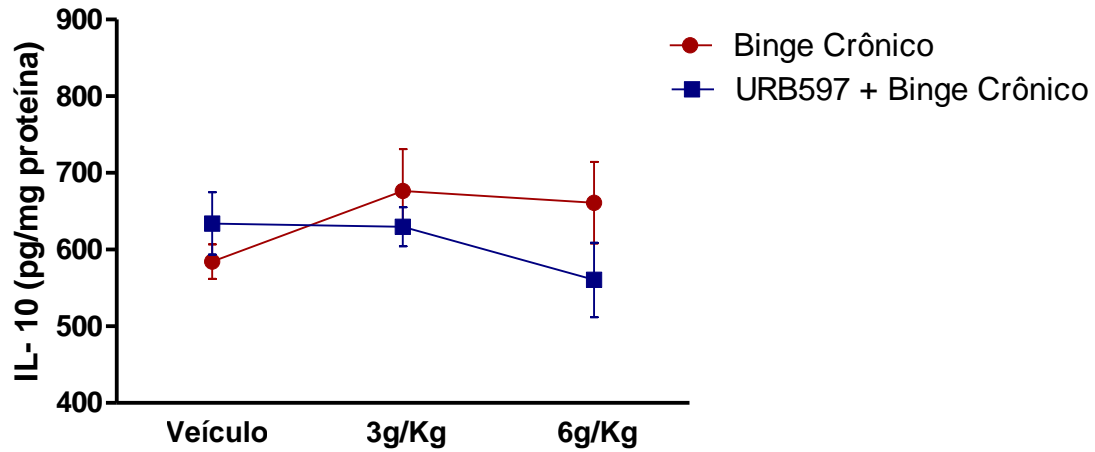


Figura 31 – Comparação dos níveis de IL-10 no hipocampo entre os grupos *Binge* Crônico e URB597 + *Binge* Crônico.

4.4 TRO

Na avaliação da memória de reconhecimento de novos objetos não foi encontrada diferença estatística na memória de curto prazo (STM), no modelo de *binge* agudo de álcool, tanto no grupo *Binge* Agudo, quanto no grupo URB597 + *Binge* Agudo (Fig. 32).

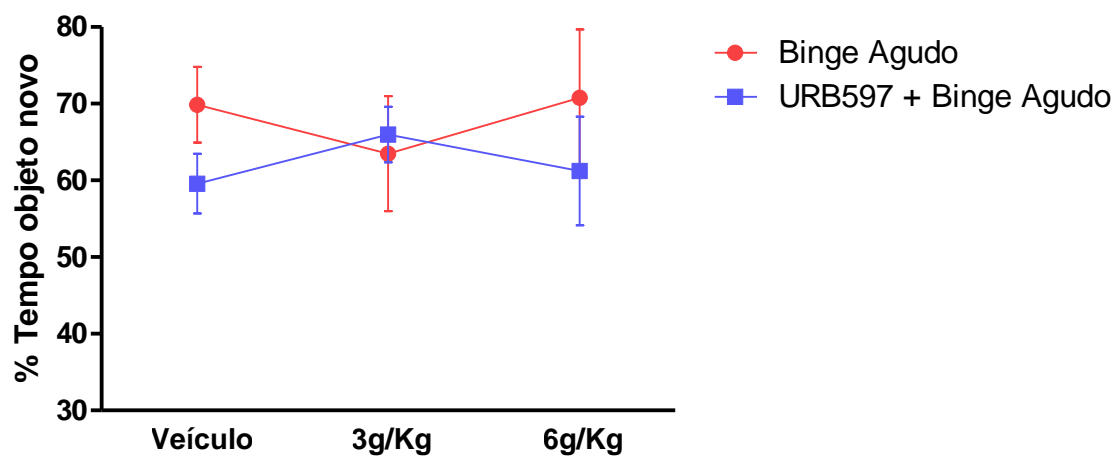


Figura 32 – Comparação da memória de curto prazo (STM) no teste de reconhecimento de objetos (TRO) entre os grupos *Binge* Agudo e URB597 + *Binge* Agudo.

Já para a memória de longo prazo (LTM) foi observada diferença estatística na comparação dos grupos *Binge* Agudo e URB597 + *Binge* Agudo [$F(1,29) = 5,315$, $p = 0,028$] na dose álcool 3g/kg, $p = 0,002$ e uma tendência à diferença na dose 6g/kg, $p = 0,094$. Houve, também, diferença intragrupo [$F(2,29) = 0,03$] no grupo *Binge* Agudo entre as doses veículo e álcool 3g/kg, $p = 0,02$; entre as doses veículo e álcool 6g/kg, $p = 0,004$ e também houve uma diferença no grupo URB597 + *Binge* Agudo entre as doses álcool 3g/kg e álcool 6g/kg, $p = 0,03$. Houve ainda uma interação entre as drogas URB e álcool [$F(2,29) = 4,475$, $p = 0,02$] (Fig. 33).

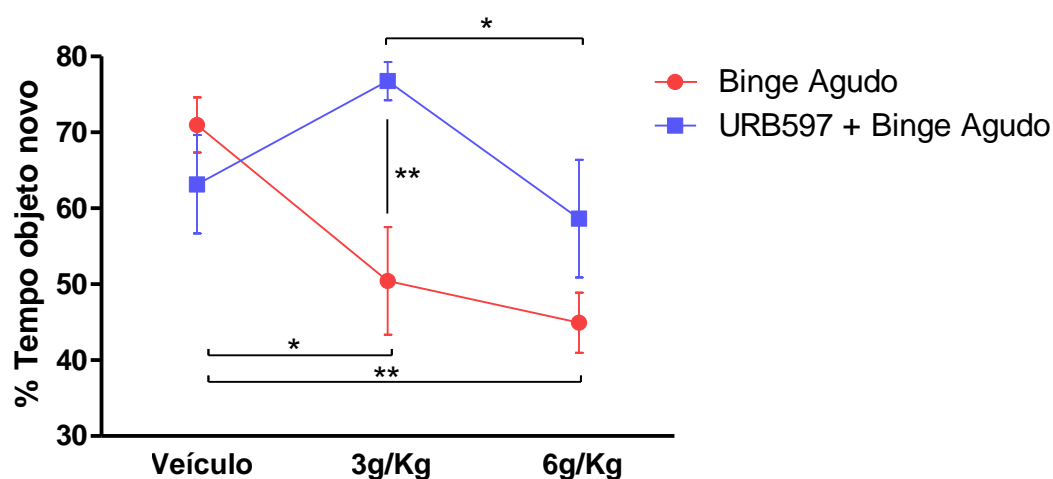


Figura 33 – Comparação da memória de longo prazo no TRO entre os grupos *Binge* Agudo e URB597 + *Binge* Agudo. Considerar (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

O modelo de *binge* crônico também não apresentou diferenças entre os grupos *Binge* Crônico e URB597 + *Binge* Crônico para a avaliação das memórias de curto prazo (STM) e longo prazo (LTM) do TRO. Apresentou-se apenas diferença intragrupo para a memória de longo prazo nas doses de álcool do grupo *Binge* Crônico [$F(2,29) = 4,206$, $p = 0,025$] entre as doses veículo álcool 6g/kg, $p = 0,024$ (Fig. 34 e 35).

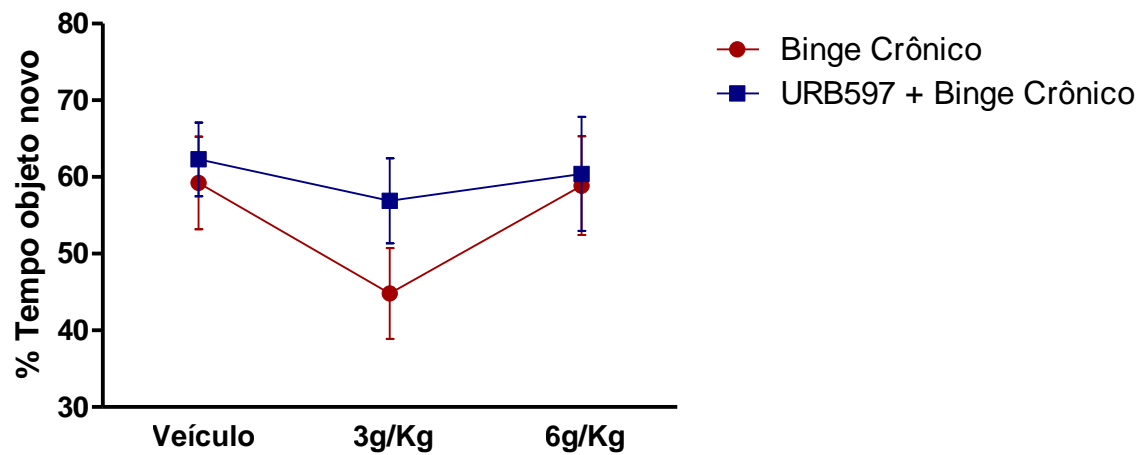


Figura 34 – Comparação da memória de curto prazo (STM) no TRO entre os grupos *Binge* Crônico e URB597 + *Binge* Crônico.

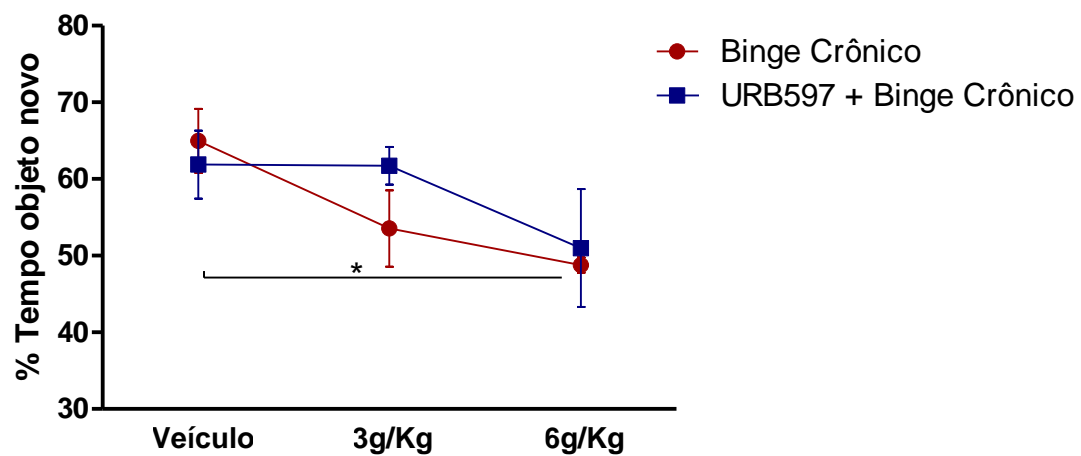


Figura 35 – Comparação da memória de longo prazo no TRO entre os grupos *Binge* Crônico e URB597 + *Binge* Crônico. Considerar (*) $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste estudo demonstram que o consumo de álcool em *binge* agudo (doses de 3 e 6 g/kg) e crônico (dose de 6 g/kg) aumentou a produção de ânion superóxido, um indicador de estresse oxidativo, no CPF de ratos adolescentes. O estresse oxidativo ocorre quando o equilíbrio normal entre eventos oxidativos e mecanismos antioxidantes endógenos é desregulado (CHEN; BUCK, 2000). Os resultados deste estudo estão de acordo com outros na literatura (MANSOURI et al., 2001b; SCOLARO et al., 2012) que demonstram aumento do estresse oxidativo em modelos de *binge* agudo e crônico. A importante novidade neste estudo foi que o estresse oxidativo causado pelo álcool foi significativamente reduzido pelo URB597, um inibidor da FAAH, na dose de 0,3 mg/kg.

A indução de estresse oxidativo no CPF causado pela administração de álcool numa dose diária alta ao longo de três dias (*binge* agudo) foi provavelmente devido à sua ação direta sobre a produção de espécies reativas (WARD, 1989). Além disso, o processo de metabolismo do etanol em si pode ter aumentado a atividade da CYP2E1, gerando EROs (DAS; VASUDEVAN, 2007; HAORAH et al., 2008), que são altamente neurotóxicas.

Estresse oxidativo também foi observado no CPF de ratos adolescentes após exposição crônica (três dias por semana ao longo de quatro semanas), mas apenas na dose mais alta do etanol (6 g/kg) utilizada neste estudo. Devido os desafios repetidos com altas doses de etanol, mudanças fisiológicas podem ter ocorrido no cérebro em resposta a sucessivas administrações do etanol, o que poderia explicar a ausência de estresse oxidativo na menor dose de etanol utilizada (3 g/kg). Esse efeito sugere que o estresse oxidativo observado após repetidas exposições da maior dose do etanol (6 g/kg) pode envolver diferentes mecanismos daqueles observados para os efeitos do *binge* agudo. De fato, o efeito crônico e prolongado pode envolver, além da sustentação da sua ação direta e produção de metabólitos tóxicos que continuam a induzir estresse oxidativo, à geração de uma resposta inflamatória, com produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação de COX-2, que contribuem para o aumento do dano pela produção de espécies reativas (BLANCO et al., 2004, 2005; VALLÉS et al., 2004).

Os resultados deste estudo demonstram que o URB597 impediu a indução de estresse oxidativo causado pelo consumo de álcool em *binge* agudo e crônico no CPF de ratos adolescentes. A inibição da FAAH aumenta as concentrações do endocanabinóide anandamida em todo o cérebro (CIPPITELLI et al., 2008; FEGLEY et al., 2005). Aumentos nas concentrações de endocanabinóides no SNC têm demonstrado efeitos neuroprotetores por inibir o estresse oxidativo. Esse efeito é mediado pela ativação de receptores do tipo CB1 (BIEGON, 2004; KIM et al., 2005), CB2 (KLEGERIS; BISSONNETTE; MCGEER, 2003), e receptores não-cannabinóides (MACCARRONE, 2000).

Outro ponto a se destacar é que alguns cannabinóides clássicos são capazes de diminuir o estresse oxidativo pois são compostos antioxidantes potentes contra EROs durante o metabolismo isquêmico ou em várias patologias cerebrais crônicas, nas quais o estresse oxidativo representa um evento crítico na sua patogênese (MARSICANO et al., 2002). Endocanabinóides, como a Anandamida e o 2-AG são sintetizados e liberados sob demanda, em resposta a diferentes estímulos (MARCO et al., 2009; PIOMELLI, 2003), e estão envolvidos em uma variedade de eventos fisiológicos, farmacológicos e patológicos (XU; CHEN, 2014), incluindo uma série de eventos relacionados à plasticidade sináptica (EDWARDS et al., 2008). Portanto, qualquer evento que possa aumentar a atividade endocanabinóide no cérebro, como através da inibição seletiva da FAAH, e conseqüentemente aumentos na concentração de Anandamida constituem um alvo importante de distúrbios neuropsiquiátricos, (CENTONZE et al., 2007; SCHERMA et al., 2008), e como os resultados deste estudo sugerem, para o abuso e dependência de álcool, como uma estratégia de redução de danos ao SNC.

Na dosagem das interleucinas pró-inflamatórias os resultados foram inconclusivos para a IL-1 β devido a perda de amostras durante as dosagens. Em compensação para as dosagens de IFN- γ e TNF α , os outros dois marcadores pró-inflamatórios, pôde se observar que no grupo *binge* agudo a exposição ao etanol por três dias consecutivos não alterou os níveis desses marcadores. Tais resultados são condizentes dados que demonstram que não ocorre uma alteração no perfil das citocinas pró-inflamatórias após administração aguda de etanol. De acordo com estudos recentes, o etanol suprime a resposta do toll like receptor 3 no uso agudo do etanol (TLR3) (PRUETT et al., 2004) e toll like receptor 4 (TLR4) (DAI; ZHANG;

PRUETT, 2005) em monócitos e macrófagos *in vitro*, diminuindo a síntese e a liberação de numerosas citocinas (GORAL; CHOUDHRY; KOVACS, 2004).

Os TLRs são responsáveis pelo reconhecimento de padrões de variadas moléculas derivadas de microrganismos e pelo estímulo às respostas imunes inatas (SZABO et al., 2007). Se tal reconhecimento ocorrer, uma sequência de sinalizações é executada e alguns genes, que codificam uma série de proteínas, dentre estas, citocinas inflamatórias, como o TNF α e as IL1 e IL2 são expressos (BLANCO; ASTROGLIALES, 2006). A via de sinalização do TLR4 resulta na ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) que sinaliza a transcrição de vários genes pró-inflamatórios (BLANCO; ASTROGLIALES, 2006).

De forma contrária, o consumo crônico de etanol está associado a um aumento dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias (MCCLAIN et al., 1999; VALLES et al., 2003) e também ao aumento das citocinas pró-inflamatórias em células gliais pela ativação de TLR4 (ALFONSO-LOECHES et al., 2010; BLANCO et al., 2005; FERNANDEZ-LIZARBE; PASCUAL; GUERRI, 2009). Alguns estudos já demonstram que consumo intermitente de álcool em altas doses é capaz de ativar a via do TLR e aumentar a liberação de marcadores pró-inflamatórios no CPF de ratos adolescentes (PASCUAL et al., 2014; VETRENO; CREWS, 2012), acarretando em disfunções cognitivas. Dessa forma, a regulação da resposta imune pelo etanol é complexa e dependente da dose, duração do tratamento, assim como do tipo celular investigado (CREWS et al., 2006).

A exposição prévia ao URB597 conseguiu diminuir os níveis de IFN- γ no CPF e hipocampo de ratos na dose de 6g/kg no tratamento agudo, e nas doses 3g/kg e 6g/kg no tratamento crônico nas regiões do CPF e hipocampo. Assim, o aumento da oferta de anandamida foi capaz de reduzir a inflamação possivelmente por efeitos locais nas células da glia, exercido tanto pela redução da liberação de fatores citotóxicos como pelo aumento de produção de moléculas pró-sobrevivência. Os dados desse estudo são condizentes com a ideia que o sistema de sinalização endocanabinóide desempenha um papel crucial nas células da glia tanto em indivíduos normais como em condições patológicas (GRUNDY; RABUFFETTI; BELTRAMO, 2001; WALTER; STELLA, 2004).

A ativação CB₁ modula a produção de citocinas inflamatórias, principalmente IL-1, TNF α , IL-6 e IL-12, que exercem papel importante em condições de neurodegeneração como no caso da isquemia cerebral (GRUNDY; RABUFFETTI; BELTRAMO, 2001). De interesse particular é o efeito inibidor dos agonistas canabinóides na produção de TNF- α , por ser este fator de grande relevância para a fisiopatologia do dano cerebral. Esses efeitos inibitórios podem ser exercidos pelo impedimento da ativação do NF- κ B, que está envolvido na indução da expressão genética das citocinas (KLEIN et al., 2000).

A ativação CB₂ também auxilia na ação anti-inflamatória. Esse efeito é de grande interesse, uma vez que este subtipo de receptor não está envolvido nos efeitos psicotrópicos dos canabinóides. Trabalhos recentes indicam que os receptores CB₂ atuam em alguns processos-chave (ex. proliferação de células da micróglia e migração em locais de lesões neuroinflamatórias) envolvidos nas fases iniciais da ativação da micróglia em resposta à infecção, inflamação ou dano tecidual (CABRAL; GRIFFIN-THOMAS, 2009). Desta forma, parece bem demonstrado que a micróglia, astrócitos e oligodendrócitos respondem aos agonistas dos canabinóides, de tal forma que os efeitos benéficos desses compostos na neuroinflamação/neurodegeneração pode estar relacionado a alguns dos seguintes acontecimentos: inibição da produção de mediadores pró-inflamatórios; potenciação da produção de fatores anti-inflamatórios; inibição do recrutamento da micróglia e potenciação da sobrevivência de astrócitos e oligodendrócitos (ver revisão de CABRAL; GRIFFIN-THOMAS, 2009).

Outro provável mecanismo de inibição da resposta inflamatória dependente de receptores CB envolve a ativação de receptores ativados por proliferadores de peroxissomas (PPAR), importantes na regulação do metabolismo, proliferação celular, apoptose e atividade anti-inflamatória (STAHEL et al., 2008). A ativação do PPAR inibe a transcrição de genes pró-inflamatórios, principalmente ao impedir o fator central de transcrição inflamatória, o NF- κ B, que dispara toda a cascata de mediadores pró-inflamatórios (LIU et al., 2003; ROCKWELL; KAMINSKI, 2004; ROCKWELL et al., 2006; SUN et al., 2006).

Poucos estudos associam uso do álcool e citocinas de resposta Th2 como IL-4 e IL-10. Num estudo em humanos que ingeriram uma única dose de álcool de 1,5 g/kg os resultados demonstraram que não houve alteração nos níveis plasmáticos de IL4 e

aumento dos níveis de IL-10 (KIM et al., 2003). Outros estudos demonstraram um aumento nos níveis de IL-10 em células dendríticas do baço e fígado (LAU; ABE; THOMSON, 2006), aumento de IL-10 em monócitos num tratamento agudo com álcool (MANDREKAR et al., 1996) e não alteração dos níveis de IL-4 plasmáticos, de várias regiões cerebrais e do tecido hepático após quatro dias de tratamento com o álcool (ZHR et al., 2010).

Os resultados apresentados no presente estudo estão parcialmente de acordo com os obtidos na literatura, pois de uma forma geral o álcool não alterou os níveis de IL-4 e IL-10 no tratamento *binge* agudo tanto no CPF quanto no hipocampo. Por outro lado, o tratamento com álcool em *binge* crônico promoveu aumento de IL-4 e IL-10 apenas no CPF.

O aumento de IL-10 no tratamento crônico pode ter ocorrido em resposta ao aumento dos níveis de TNF- α e IFN- γ , uma vez que um dos papéis principais de IL-10 é a inibição desses mediadores pró-inflamatórios (VARELLA; FORTE, 2001). É importante ressaltar que em todos os estudos o padrão de tratamento (agudo/crônico) e as doses foram diferentes, o que pode levar também a resultados e interpretações diferentes e ainda deve ser levado em consideração que o padrão de consumo em *binge* é um fator que pode ser relevante nos resultados.

A administração prévia do inibidor da FAAH URB597 não interferiu na resposta do padrão das interleucinas IL-4 e IL-10 no tratamento agudo. De forma contrária, no tratamento em *binge* crônico foi capaz de reverter o aumento de IL-4 e IL-10, provavelmente pelo fato dessa droga inibir os processos inflamatórios e de estresse oxidativo causados pelo álcool, não sendo mais necessária a liberação de fatores anti-inflamatórios que ocorre após a alta dos fatores pró-inflamatórios.

A exposição ao álcool pode interferir nos níveis de BDNF de diferentes maneiras, sendo dependente da dose de etanol, o tempo de exposição e a região do cérebro investigada (RAIVIO et al., 2012). No presente estudo o consumo de álcool em *binge* afetou os níveis de BDNF apenas no tratamento em *binge* crônico, tanto no CPF quanto no hipocampo, com aumento dos níveis dessa neurotrofina. Dados na literatura corroboram com os achados desse estudo (MILLER; MOONEY, 2004; MILLER, 2004). Outro estudo revelou aumento da produção de mRNA do BDNF em regiões como hipocampo e hipotálamo (TAPIA-ARANCIBIA et al., 2001); além do

mais BDNF e seu receptor TrkB sofrem regulação positiva em processos inflamatórios (LIN et al., 2011) na tentativa de proteger o tecido lesado.

Em contrapartida, alguns grupos de pesquisadores apontam uma diminuição dos níveis de BDNF após o uso do álcool em diferentes regiões cerebrais (ZHANG et al., 2000) ou então que o uso de álcool não provoca alterações na liberação de BDNF (ver revisão de DAVIS, 2008).

O BDNF desempenha papel efetivo como regulador de várias funções importantes como aprendizagem e memória, depressão e estresse (BRAMHAM; MESSAOUDI, 2005; DUMAN, 2004; NESTLER et al., 2002; POO, 2001; SHIRAYAMA et al., 2002). Por isso, possui um papel de regulador da plasticidade sináptica e ainda pode contribuir com as mudanças neuroadaptativas causadas pelas drogas de abuso (RAIVIO et al., 2012), sendo que alguns autores sugerem sua atuação na adição de drogas (GHITZA et al., 2010) por aumento da expressão de BDNF no núcleo accumbens após exposição ao etanol.

Dessa forma, a alteração causada pelo álcool nos níveis de BDNF - aumento em curto e médio prazo e diminuição em alcoolistas crônicos (LOGRIP; JANAK; RON, 2009) - pode estar relacionado a uma resposta de proteção do tecido, podendo levar a uma plasticidade sináptica anormal que pode ocorrer em consumidores de álcool (BERNIER; WHITAKER; MORIKAWA, 2011) e gera também o aumento de seu consumo (LOGRIP; JANAK; RON, 2009), principalmente entre jovens e adolescentes, interferindo no desenvolvimento de estruturas cerebrais e de funções cognitivas (THOMPSON et al., 2004; WHITE, 2003). Em outras palavras, essa plasticidade sináptica anormal de regiões como o CPF e hipocampo causado pelo aumento do BDNF através do consumo do álcool em *binge*, se torna importante em relação ao comportamento de adição e prejuízos relacionados à memória e aprendizagem de consumidores de álcool.

Algumas evidências demonstram uma interação entre a sinalização dos receptores CB e liberação de BDNF, principalmente mostrando que a ativação do sistema canabinóide está relacionada ao aumento da expressão de BDNF, mRNA do BDNF ou de seu receptor TrkB em diferentes áreas cerebrais (ASO et al., 2008; BEYER et al., 2010; BUTOVSKY et al., 2005; D'SOUZA et al., 2009).

Tais resultados são contrários aos encontrados neste estudo, onde a administração prévia do URB597 inibiu o aumento dos níveis de BDNF causado pelo consumo de álcool no grupo crônico. Entretanto, um ponto importante a se destacar é que na maioria dos estudos que relacionam o aumento da expressão de BDNF pela ativação da sinalização endocanabinóide ocorreu em indivíduos saudáveis, sem perturbação ou insultos que promovessem alterações na homeostase do tecido cerebral.

De forma diferente, a administração de álcool em *binge* foi capaz de alterar a expressão do BDNF, além de induzir o estresse oxidativo e alterar o perfil das citocinas no CPF e hipocampo dos ratos. É possível que o aumento da liberação do BDNF tenha sido em resposta ao aumento do estresse oxidativo e do processo inflamatório gerado pelo consumo de álcool, e que o aumento dessa neurotrofina tenha sido uma tentativa de proteger o tecido cerebral e aumentar a sobrevivência celular, papel desempenhado pelo BDNF durante processos inflamatórios não só no cérebro (CHO et al., 1997; KERSCHENSTEINER et al., 1999), mas também em tecidos periféricos (ODDIAH et al., 1998) e em doenças neurodegenerativas (FARIA et al., 2014).

Pode-se entender então que a ativação do sistema endocanabinóide possa inibir a produção de EROs e processos inflamatórios, como já discutido acima, e essa ação impeça a maior produção da neurotrofina BDNF em resposta a lesões no tecido cerebral, mantendo seus valores próximos do normal – já que os valores retornam para níveis bem próximos aos do grupo controle.

Para avaliação do prejuízo das funções cerebrais causado pelo consumo de álcool em *binge* agudo e crônico foi utilizado um teste comportamental denominado tarefa de reconhecimento de objetos (TRO). Essa ferramenta é muito útil para avaliação da memória do tipo episódica em animais. Descrita inicialmente por Tulving (1972) é tida como um dos principais sistemas de memórias neurocognitivas. É a “memória para eventos pessoalmente experimentados” (autobiográfica) que provê informações sobre o que, quando e onde ocorreu um evento específico.

O TRO foi descrito inicialmente por (ENNACEUR; DELACOUR, 1988), baseado na habilidade exploratória natural de roedores expostos a um novo ambiente. A diferença na exploração entre um objeto previamente conhecido e um objeto novo é

dada como um índice de desempenho da memória (BERTAINA-ANGLADE et al., 2006). Algumas de suas vantagens são que a TRO oferece a possibilidade de obter informação rápida, além de não requerer exposição a um estímulo aversivo e nem restrição hídrica ou alimentar (DERE; HUSTON; DE SOUZA SILVA, 2007).

Muitos estudos sugerem que a integridade funcional do lobo temporal, mais especificamente da formação hipocampal, é essencial para codificar e armazenar memórias de reconhecimento (CLARK; ZOLA; SQUIRE, 2000; ENNACEUR; DELACOUR, 1988; KELLY; LAROCHE; DAVIS, 2003; LEE; EVERITT; THOMAS, 2004; LOGOTHETIS; SHEINBERG, 1996; RIESENHUBER; POGGIO, 2002).

Outros estudos também demonstram a importância do CPF na participação da memória de reconhecimento (AKIRAV; MAROUN, 2006), principalmente relacionado com retardos de 24h (BARKER et al., 2007). Ainda, há evidências que sugerem que o CPF tem um papel importante na discriminação de objeto. Por exemplo, em primatas não-humanos e ratos, lesões no CPF prejudicam o desempenho em tarefas de discriminação de familiaridade de objetos (BACHEVALIER; MISHKIN, 1986; MEUNIER, 1997; RAGOZZINO; DETRICK; KESNER, 2002).

O consumo de álcool em *binge* foi capaz de prejudicar a memória de reconhecimento tanto no tratamento agudo (nas doses 3g/kg e 6g/kg), quanto no tratamento crônico (dose de 6g/kg). Muitos estudos estão de acordo com esses achados demonstrando que o consumo de álcool prejudica a memória de reconhecimento de odores (SPINETTA et al., 2008), a memória de reconhecimento de objetos após o consumo de álcool crônico (DELWING et al., 2009; GARCÍA-MORENO et al., 2002) e após o consumo tipo *binge* (CIPPITELLI et al., 2010; PASCUAL et al., 2007).

Um fato importante a ressaltar é que esse prejuízo só foi notado no retardo de 24h, na memória de longo prazo. Tais resultados podem significar prejuízos na consolidação dessa memória, dependente de síntese de proteínas e plasticidade sináptica, causado pelo efeito deletério do álcool no SNC. Corroborando essa afirmação, alguns trabalhos demonstram que a consolidação da memória de reconhecimento de objetos é dependente da síntese de proteínas e transcrição de DNA na região do hipocampo (MYSKIW et al., 2008; ROSSATO et al., 2007).

Muitos dos efeitos prejudiciais causados pelo álcool podem ser devido ao fato de o cérebro adolescente estar em pleno desenvolvimento e por isso passa por várias alterações estruturais e funcionais para o amadurecimento dos processos cognitivos (HILLER-STURMHÖFEL; SWARTZWELDER, 2005; NIXON; MCCLAIN, 2010; TOGA; THOMPSON; SOWELL, 2006). Pode-se então considerar que durante a fase de amadurecimento do cérebro o álcool gera danos e que tais efeitos geralmente são irreversíveis (GUERRI, 2002). Daí pode-se esperar que o consumo de álcool em *binge* durante a adolescência afete a maturação do cérebro, alterações na plasticidade sináptica, e leve a prejuízos ao longo da vida afetando funções cognitivas como aprendizagem, memória e funções motoras (HILLER-STURMHÖFEL; SWARTZWELDER, 2005).

Tais prejuízos podem estar associados com os processos oxidativos e inflamatórios desenvolvidos pelo consumo de álcool em *binge*, que causam lesões hipocampais (DE BELLIS et al., 2000; WHITE; SWARTZWELDER, 2005) e no córtex frontal (CREWS et al., 2000).

A administração prévia do inibidor da FAAH URB597 não foi capaz de reverter o prejuízo na memória de reconhecimento causado pelo consumo de álcool em *binge*, exceto na dose de 3g/kg no tratamento agudo. Esse resultado já era previsto, uma vez que a ativação do sistema endocanabinóide pelo Δ^9 -THC está relacionada a prejuízos na memória em diversas tarefas (NAKAMURA et al., 1991; RODRIGUES; CONTI; NAKAMURA-PALACIOS, 2011). Agonistas sintéticos também são capazes de induzir prejuízos na memória (BARNA et al., 2007; HAMPSON; DEADWYLER, 1999; HAN et al., 2000; LICHTMAN; DIMEN; MARTIN, 1995). Em relação à memória de reconhecimento, agonistas canabinóides impediram a formação da memória para tarefas de reconhecimento de objetos (CICCOCIOPPO et al., 2002; KOSIOREK et al., 2003).

A partir de estudos com o antagonista SR141716A, seletivo para CB₁, foi observada uma reversão dos efeitos prejudiciais à memória causados pelo uso de agonistas canabinóides (BARNA et al., 2007; HAMPSON; DEADWYLER, 2000; LICHTMAN, 2000; MALLET; BENINGER, 1998).

Diante dos resultados obtidos, a inibição da FAH pelo URB597 promoveu um aumento da disponibilidade de Anandamida que irá atuar nos dois receptores

canabinóides, que promovem sua ação neuroprotetora principalmente através do receptor CB₂ pela inibição da ativação microglial e atua na inibição da consolidação da memória através de receptores CB₁.

Em relação à melhora da memória de reconhecimento no grupo URB597 + *Binge* agudo na dose de 3g/kg pode ser explicado pela diminuição de Anandamida causada pelo uso agudo de álcool descrita no trabalho de Rubio et al. (2007). Este estudo sustenta a ideia que a administração aguda de álcool diminui os níveis de Anandamida. Assim, a administração prévia de URB597 preveniu essa queda dos níveis de Anandamida, o que pode reverter o prejuízo da memória de reconhecimento por restaurar os níveis normais desse endocanabinóide no cérebro. Porém esse resultado é contrário à maioria dos encontrados na literatura a respeito da atuação do sistema endocanabinóide em relação à memória.

Em síntese, os resultados deste estudo demonstram que o consumo de álcool em *binge* agudo e crônico por ratos adolescentes produz efeitos neurotóxicos no CPF e hipocampo, e que o tratamento prévio com o inibidor da FAAH URB597 bloqueou a neurotoxicidade nessas áreas cerebrais, envolvidas no abuso e dependência de drogas, e em processos cognitivos.

É importante ressaltar que mais estudos são necessários para avaliar de uma forma mais específica o estresse oxidativo no CPF, uma vez que a técnica histológica usando o DHE proporciona uma medida indireta e semi-quantitativa da produção de EROs. Associado a este fato, o CPF não possui estruturas que o delimitam, o que pode gerar erros na demarcação da zona a ser avaliada.

Outro ponto importante que pode ser ressaltado é que em estudos futuros é necessário a avaliação e comparação do desempenho de agonistas seletivos para CB₁ e CB₂ e se os efeitos apresentados são revertidos com o uso de antagonistas canabinóides, já que alguns dos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios estão associados em alguns casos a CB₁ e outros a CB₂. Mais estudos também são necessários para confirmar por quais mecanismos a manipulação do sistema endocanabinóide pode exercer seu papel neuroprotetor. Dessa forma é necessário que seja investigado alguns dos mecanismos proposto no estudo como a inibição da ativação microglial e do PPAR pela ativação dos receptores CB.

Assim, sugere-se que o sistema endocanabinóide está envolvido no efeito neuroprotetor sobre a neurotoxicidade causada pelo consumo de álcool em *binge* na adolescência.

6 CONCLUSÕES

- O consumo de etanol em *binge* agudo e crônico aumentou a produção de espécies reativas e conseqüentemente induziu estresse oxidativo no CPF de ratos adolescentes. A administração prévia de URB597 reduziu o estresse oxidativo causado pelo consumo de etanol em *binge* agudo e crônico em ratos adolescentes.
- O consumo de etanol em *binge* crônico aumentou os níveis da neurotrofina BDNF, e a administração prévia do URB597 reduziu os níveis da neurotrofina.
- O tratamento com álcool em *binge* crônico aumentou os níveis de IFN- γ , TNF- α no CPF e hipocampo, e IL-4 e IL-10 no CPF de ratos adolescentes. A administração prévia de URB597 foi capaz de reverter o aumento da expressão das citocinas causado pelo consumo de álcool no formato de *binge* agudo e crônico.

- O consumo de álcool em *binge* agudo e crônico prejudicou a memória de reconhecimento de longo prazo (24 h) de ratos adolescentes, e a administração prévia do URB597 foi bloqueou o prejuízo causado pelo consumo de álcool em *binge* agudo apenas na dose de 3g/kg.

7 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; JANEWAY, C. A. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 129–38, 7 jan. 2000.

AGAR, E. et al. The effects of ethanol consumption on the lipid peroxidation and glutathione levels in the right and left brains of rats. **The International journal of neuroscience**, v. 113, n. 12, p. 1643–52, dez. 2003.

AHN, K.; MCKINNEY, M. K.; CRAVATT, B. F. Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. **Chemical reviews**, v. 108, n. 5, p. 1687–707, maio 2008.

AKIRAV, I.; MAROUN, M. Ventromedial prefrontal cortex is obligatory for consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)**, v. 16, n. 12, p. 1759–65, dez. 2006.

ALFONSO-LOECHES, S. et al. Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 30, n. 24, p. 8285–95, 16 jun. 2010.

AREND, W. P. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. **The Journal of clinical investigation**, v. 88, n. 5, p. 1445–51, nov. 1991.

ASO, E. et al. BDNF impairment in the hippocampus is related to enhanced despair behavior in CB1 knockout mice. **Journal of neurochemistry**, v. 105, n. 2, p. 565–72, abr. 2008.

ATWOOD, B. K.; MACKIE, K. CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. **British journal of pharmacology**, v. 160, n. 3, p. 467–79, jun. 2010.

BACHEVALIER, J.; MISHKIN, M. Visual recognition impairment follows ventromedial but not dorsolateral prefrontal lesions in monkeys. **Behavioural Brain Research**, v. 20, n. 3, p. 249–261, jun. 1986.

BADGER, T. M. et al. Pulsatile blood alcohol and CYP2E1 induction during chronic alcohol infusions in rats. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 10, n. 6, p. 453–7, 1993.

BAEK, J. K.; HEATON, M. B.; WALKER, D. W. Up-regulation of high-affinity neurotrophin receptor, trk B-like protein on western blots of rat cortex after chronic ethanol treatment. **Brain research. Molecular brain research**, v. 40, n. 1, p. 161–4, ago. 1996.

BARBAS, H. Connections underlying the synthesis of cognition, memory, and emotion in primate prefrontal cortices. **Brain research bulletin**, v. 52, n. 5, p. 319–30, 15 jul. 2000.

BARDE, Y. A.; EDGAR, D.; THOENEN, H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. **The EMBO journal**, v. 1, n. 5, p. 549–53, jan. 1982.

BARKER, G. R. I. et al. Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 11, p. 2948–57, 14 mar. 2007.

BARNA, I. et al. WIN-55,212-2 chronically implanted into the CA3 region of the dorsal hippocampus impairs learning: a novel method for studying chronic, brain-area-specific effects of cannabinoids. **Behavioural pharmacology**, v. 18, n. 5-6, p. 515–20, set. 2007.

BEAULIEU P, LUSSIER D, P. F. ET AL. **Pharmacology of pain BEAULIEU Pierre: Librairie Lavoisier**. p. 279–302, 2010.

BECHARA, A. et al. Decision-making deficits, linked to a dysfunctional ventromedial prefrontal cortex, revealed in alcohol and stimulant abusers. **Neuropsychologia**, v. 39, n. 4, p. 376–89, jan. 2001.

BERNIER, B. E.; WHITAKER, L. R.; MORIKAWA, H. Previous ethanol experience enhances synaptic plasticity of NMDA receptors in the ventral tegmental area. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 14, p. 5205–12, 6 abr. 2011.

BERTAINA-ANGLADE, V. et al. The object recognition task in rats and mice: a simple and rapid model in safety pharmacology to detect amnesic properties of a

new chemical entity. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 54, n. 2, p. 99–105, 2006.

BERTONI, N. et al. [Alcohol and illicit drug use and its influence on the sexual behavior of teenagers from Minas Gerais State, Brazil]. **Cadernos de saúde pública**, v. 25, n. 6, p. 1350–60, jun. 2009.

BEYER, C. E. et al. Depression-like phenotype following chronic CB1 receptor antagonism. **Neurobiology of disease**, v. 39, n. 2, p. 148–55, ago. 2010.

BLANCO, A. M. et al. Ethanol-induced iNOS and COX-2 expression in cultured astrocytes via NF-kappa B. **Neuroreport**, v. 15, n. 4, p. 681–5, 22 mar. 2004.

BLANCO, A. M. et al. Involvement of TLR4/type I IL-1 receptor signaling in the induction of inflammatory mediators and cell death induced by ethanol in cultured astrocytes. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 175, n. 10, p. 6893–9, 15 nov. 2005.

BLANCO, A. M.; ASTROGLIALES, C.; TLR, Y. D. E. L. O. S. R. Alcohol and neuroinflammation: Involvement of astroglial cells and TLR4 / IL-1RI receptors. **Inmunología**, v. 25, p. 188–200, 2006.

BRAMHAM, C. R.; MESSAOUDI, E. BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. **Progress in neurobiology**, v. 76, n. 2, p. 99–125, jun. 2005.

BREWER, R. D.; SWAHN, M. H. Binge drinking and violence. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 294, n. 5, p. 616–8, 3 ago. 2005.

BROWN, M. A.; HURAL, J. Functions of IL-4 and control of its expression. **Critical reviews in immunology**, v. 17, n. 1, p. 1–32, jan. 1997.

BUTOVSKY, E. et al. In vivo up-regulation of brain-derived neurotrophic factor in specific brain areas by chronic exposure to Delta-tetrahydrocannabinol. **Journal of neurochemistry**, v. 93, n. 4, p. 802–11, maio 2005.

CABALLERÍA, J. Current concepts in alcohol metabolism. **Annals of hepatology**, v. 2, n. 2, p. 60–8, 2003.

CABRAL, G. A. et al. CB2 receptors in the brain: role in central immune function. **British journal of pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 240–51, jan. 2008.

CABRAL, G. A.; GRIFFIN-THOMAS, L. Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 11, p. e3, jan. 2009.

CALABRESE, V. et al. Stress Proteins and SH-Groups in Oxidant-Induced Cellular Injury After Chronic Ethanol Administration in Rat. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, n. 7, p. 1159–1167, 1998.

CARDENAS, V. A. et al. Chronic active heavy drinking and family history of problem drinking modulate regional brain tissue volumes. **Psychiatry research**, v. 138, n. 2, p. 115–30, 28 fev. 2005.

CENTONZE, D. et al. The endocannabinoid system in targeting inflammatory neurodegenerative diseases. **Trends in pharmacological sciences**, v. 28, n. 4, p. 180–7, abr. 2007.

CHAO, M. V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 4, n. 4, p. 299–309, abr. 2003.

CHEN, Y.; BUCK, J. Cannabinoids protect cells from oxidative cell death: a receptor-independent mechanism. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 293, n. 3, p. 807–12, jun. 2000.

CHO, H.-J. et al. Increased brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity in rat dorsal root ganglia and spinal cord following peripheral inflammation. **Brain Research**, v. 764, n. 1-2, p. 269–272, ago. 1997.

CICCOCIOPO, R. et al. Memory impairment following combined exposure to delta(9)-tetrahydrocannabinol and ethanol in rats. **European journal of pharmacology**, v. 449, n. 3, p. 245–52, 9 ago. 2002.

CIPPITELLI, A. et al. Increase of brain endocannabinoid anandamide levels by FAAH inhibition and alcohol abuse behaviours in the rat. **Psychopharmacology**, v. 198, n. 4, p. 449–60, jul. 2008.

CIPPITELLI, A. et al. Reversibility of object recognition but not spatial memory impairment following binge-like alcohol exposure in rats. **Neurobiology of learning and memory**, v. 94, n. 4, p. 538–46, nov. 2010.

CLARK, I. A. How TNF was recognized as a key mechanism of disease. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 18, n. 3-4, p. 335–43, 2007.

CLARK, R. E.; ZOLA, S. M.; SQUIRE, L. R. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 23, p. 8853–60, 1 dez. 2000.

CREWS, F. T. et al. Binge ethanol consumption causes differential brain damage in young adolescent rats compared with adult rats. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 24, n. 11, p. 1712–23, nov. 2000.

CREWS, F. T. et al. Cytokines and alcohol. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 30, n. 4, p. 720–30, abr. 2006.

CURFS, J. H.; MEIS, J. F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical microbiology reviews**, v. 10, n. 4, p. 742–80, out. 1997.

CURTIS, D. R.; JOHNSTON, G. A. Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system. **Ergebnisse der Physiologie, biologischen Chemie und experimentellen Pharmakologie**, v. 69, p. 97–188, jan. 1974.

D'SOUZA, D. C. et al. Preliminary evidence of cannabinoid effects on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in humans. **Psychopharmacology**, v. 202, n. 4, p. 569–78, mar. 2009.

DAI, Q.; ZHANG, J.; PRUETT, S. B. Ethanol alters cellular activation and CD14 partitioning in lipid rafts. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 332, n. 1, p. 37–42, 24 jun. 2005.

DALGLEISH, A. G.; O'BYRNE, K. Inflammation and cancer: the role of the immune response and angiogenesis. **Cancer treatment and research**, v. 130, p. 1–38, jan. 2006.

DALLEY, J. W.; CARDINAL, R. N.; ROBBINS, T. W. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 28, n. 7, p. 771–84, nov. 2004.

DAS, S. K.; VASUDEVAN, D. M. Alcohol-induced oxidative stress. **Life Sciences**, v. 81, n. 3, p. 177–187, 2007.

DAVIES, D. L. et al. Ethanol sensitivity in ATP-gated P2X receptors is subunit dependent. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 26, n. 6, p. 773–8, jun. 2002.

DAVIS, M. I. Ethanol-BDNF interactions: still more questions than answers. **Pharmacology & therapeutics**, v. 118, n. 1, p. 36–57, abr. 2008.

DE BELLIS, M. D. et al. Hippocampal volume in adolescent-onset alcohol use disorders. **The American journal of psychiatry**, v. 157, n. 5, p. 737–44, maio 2000.

DE LA MONTE, S. M. et al. The liver-brain axis of alcohol-mediated neurodegeneration: role of toxic lipids. **International journal of environmental research and public health**, v. 6, n. 7, p. 2055–75, jul. 2009.

DELWING, D. et al. Efeitos da administração crônica de etanol sobre a aprendizagem no reconhecimento de objetos em camundongos nadadores. v. 1, p. 26–31, 2009.

DERE, E.; HUSTON, J. P.; DE SOUZA SILVA, M. A. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 31, n. 5, p. 673–704, 2007.

DEVANE, W. A. et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science (New York, N.Y.)**, v. 258, n. 5090, p. 1946–9, 18 dez. 1992.

DI MARZO, V. "Endocannabinoids" and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1392, n. 2-3, p. 153–75, 15 jun. 1998.

DI MARZO, V. et al. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. **Nature**, v. 410, n. 6830, p. 822–5, 12 abr. 2001.

DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, n. 6, p. 2095–147, 15 mar. 1996.

DINARELLO, C. A. Historical insights into cytokines. **European journal of immunology**, v. 37 Suppl 1, p. S34–45, nov. 2007.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, v. 82, n. 1, p. 47–95, jan. 2002.

DUALIBI, S.; LARANJEIRA, R. [Alcohol-related public policies]. **Revista de saúde pública**, v. 41, n. 5, p. 839–48, out. 2007.

DUMAN, R. S. Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders. **Neuromolecular medicine**, v. 5, n. 1, p. 11–25, jan. 2004.

DURAZZO, T. C. et al. Cigarette smoking exacerbates chronic alcohol-induced brain damage: a preliminary metabolite imaging study. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 28, n. 12, p. 1849–60, dez. 2004.

EDWARDS, D. A.; ZHANG, L.; ALGER, B. E. Metaplastic control of the endocannabinoid system at inhibitory synapses in hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 23, p. 8142–7, 10 jun. 2008.

EL-HASHEMITE, N. et al. Perturbed IFN-gamma-Jak-signal transducers and activators of transcription signaling in tuberous sclerosis mouse models: synergistic effects of rapamycin-IFN-gamma treatment. **Cancer research**, v. 64, n. 10, p. 3436–43, 15 maio 2004.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural brain research**, v. 31, n. 1, p. 47–59, 1 nov. 1988.

FARIA, M. C. et al. Increased plasma levels of BDNF and inflammatory markers in Alzheimer's disease. **Journal of psychiatric research**, 13 fev. 2014.

FARRAR, M. A.; SCHREIBER, R. D. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. **Annual review of immunology**, v. 11, p. 571–611, jan. 1993.

FEGLEY, D. et al. Characterization of the fatty acid amide hydrolase inhibitor cyclohexyl carbamic acid 3'-carbamoyl-biphenyl-3-yl ester (URB597): effects on anandamide and oleoylethanolamide deactivation. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 313, n. 1, p. 352–8, abr. 2005.

FERIGOLO, M. et al. Prevalência do consumo de drogas na FEBEM, Porto Alegre. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, n. 1, p. 10–16, mar. 2004.

FERNANDEZ-LIZARBE, S.; PASCUAL, M.; GUERRI, C. Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 7, p. 4733–44, 1 out. 2009.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61–68, mar. 1997.

FINESCHI, V. et al. Markers of cardiac oxidative stress and altered morphology after intraperitoneal cocaine injection in a rat model. **International journal of legal medicine**, v. 114, n. 6, p. 323–30, jan. 2001.

FINKBEINER, S. et al. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. **Neuron**, v. 19, n. 5, p. 1031–47, nov. 1997.

FLOYD, R. A. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)**, v. 222, n. 3, p. 236–45, dez. 1999.

FRANCISCHETTI, E. A.; DE ABREU, V. G. The endocannabinoid system: a new perspective for cardiometabolic risk control. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 87, n. 4, p. 548–58, out. 2006.

FUSTER, J. M. Synopsis of function and dysfunction of the frontal lobe. **Acta psychiatrica Scandinavica. Supplementum**, v. 395, p. 51–7, jan. 1999.

FUSTER, J. M. The prefrontal cortex--an update: time is of the essence. **Neuron**, v. 30, n. 2, p. 319–33, maio 2001.

FUSTER, J. M. **The Prefrontal Cortex, Fourth Edition**. Academic Press, p. 424, 2008.

GALDURÓZ, J. C. F.; CAETANO, R. [Epidemiology of alcohol use in Brazil]. **Revista brasileira de psiquiatria (São Paulo, Brazil : 1999)**, v. 26 Suppl 1, p. S3–6, maio 2004.

GALDURÓZ, J. C. F.; CARLINI, E. A. Use of alcohol among the inhabitants of the 107 largest cities in Brazil--2001. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica**, v. 40, n. 3, p. 367–75, mar. 2007.

GARCÍA-MORENO, L. M. et al. Chronic ethanol intake and object recognition in young and adult rats. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 26, n. 5, p. 831–7, jun. 2002.

GARDNER, E. L. Endocannabinoid signaling system and brain reward: emphasis on dopamine. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 81, n. 2, p. 263–84, jun. 2005.

GEORGE, O.; KOOB, G. F. Individual differences in prefrontal cortex function and the transition from drug use to drug dependence. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 35, n. 2, p. 232–47, nov. 2010.

GHITZA, U. E. et al. Role of BDNF and GDNF in drug reward and relapse: a review. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 35, n. 2, p. 157–71, nov. 2010.

GILPIN, N. W.; KOOB, G. F. Neurobiology of Alcohol Dependence: Focus on Motivational Mechanisms. **Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism**, v. 31, n. 3, p. 185–195, jan. 2008.

GIOVANNINI, M. G. et al. Experimental brain inflammation and neurodegeneration as model of Alzheimer's disease: protective effects of selective COX-2 inhibitors. **International journal of immunopathology and pharmacology**, v. 16, n. 2 Suppl, p. 31–40, 2003.

GODOY-MATOS, A. F. DE et al. O sistema endocanabinóide: novo paradigma no tratamento da síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 390–399, abr. 2006.

GÖNENÇ, S. et al. Effects of melatonin on oxidative stress and spatial memory impairment induced by acute ethanol treatment in rats. **Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 54, n. 3, p. 341–8, jan. 2005.

GONZÁLEZ, A.; PARIENTE, J. A.; SALIDO, G. M. Ethanol stimulates ROS generation by mitochondria through Ca²⁺ mobilization and increases GFAP content in rat hippocampal astrocytes. **Brain research**, v. 1178, p. 28–37, 31 out. 2007.

GORAL, J.; CHOUDHRY, M. A.; KOVACS, E. J. Acute ethanol exposure inhibits macrophage IL-6 production: role of p38 and ERK1/2 MAPK. **Journal of leukocyte biology**, v. 75, n. 3, p. 553–9, mar. 2004.

GOSHEN, I.; YIRMIYA, R. Interleukin-1 (IL-1): a central regulator of stress responses. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 30, n. 1, p. 30–45, jan. 2009.

GRUNDY, R. I.; RABUFFETTI, M.; BELTRAMO, M. Cannabinoids and neuroprotection. **Molecular neurobiology**, v. 24, n. 1-3, p. 29–51, 2001.

GUERRI, C. Mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal ethanol exposure. **Neurotoxicity research**, v. 4, n. 4, p. 327–35, jun. 2002.

GUINDON, J.; HOHMANN, A. G. The endocannabinoid system and pain. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 8, n. 6, p. 403–21, dez. 2009.

HALLIWELL, B. The wanderings of a free radical. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 5, p. 531–542, 2009.

HALLIWELL, BARRY; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology & medicine, 4th Ed. (paper)** HALLIWELL Barry, GUTTERIDGE John: Librairie Lavoisier. p. 936, 1999.

HAMELINK, C. et al. Comparison of cannabidiol, antioxidants, and diuretics in reversing binge ethanol-induced neurotoxicity. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 314, n. 2, p. 780–8, ago. 2005.

HAMPSON, R. E.; DEADWYLER, S. A. Cannabinoids, hippocampal function and memory. **Life sciences**, v. 65, n. 6-7, p. 715–23, jan. 1999.

HAMPSON, R. E.; DEADWYLER, S. A. Cannabinoids reveal the necessity of hippocampal neural encoding for short-term memory in rats. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 23, p. 8932–42, 1 dez. 2000.

HAN, C. J. et al. A performance-dependent adjustment of the retention interval in a delayed non-matching-to-position paradigm differentiates effects of amnestic drugs in rats. **European journal of pharmacology**, v. 403, n. 1-2, p. 87–93, 1 set. 2000.

HANISCH, U.-K. Microglia as a source and target of cytokines. **Glia**, v. 40, n. 2, p. 140–55, dez. 2002.

HARPER, C. et al. Neuropathological alterations in alcoholic brains. Studies arising from the New South Wales Tissue Resource Centre. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 27, n. 6, p. 951–61, set. 2003.

HILLER-STURMHÖFEL, S.; SWARTZWELDER, H. S. Alcohol ' s Effects on the Adolescent Brain. **Alcohol. Res. Health**, v. 28, p. 213–221, 2005.

HIRSCH, E. C.; HUNOT, S.; HARTMANN, A. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. **Parkinsonism & related disorders**, v. 11 Suppl 1, p. S9–S15, jun. 2005.

HUANG, M.-C. et al. The correlation between early alcohol withdrawal severity and oxidative stress in patients with alcohol dependence. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 1, p. 66–69, 2009.

HUNT, W. A. Are binge drinkers more at risk of developing brain damage? **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 10, n. 6, p. 559–61, 1993.

HUTTENLOCHER, P. R.; DABHOLKAR, A. S. Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. **The Journal of comparative neurology**, v. 387, n. 2, p. 167–78, 20 out. 1997.

HWANG, J. et al. Enhancement of endocannabinoid signaling by fatty acid amide hydrolase inhibition: a neuroprotective therapeutic modality. **Life sciences**, v. 86, n. 15-16, p. 615–23, 10 abr. 2010.

IZQUIERDO, I. et al. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v. 393, n. 6686, p. 635–6, 18 jun. 1998.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. On brain lesions, the milkman and Sigmunda. **Trends in neurosciences**, v. 21, n. 10, p. 423–6, [s.d.].

JOHANSEN, J. S. et al. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. **Cardiovascular diabetology**, v. 4, n. 1, p. 5, jan. 2005.

KELLY, A.; LAROCHE, S.; DAVIS, S. Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 12, p. 5354–60, 15 jun. 2003.

KELSO, A. Th1 and Th2 subsets: paradigms lost? **Immunology today**, v. 16, n. 8, p. 374–9, ago. 1995.

KERNS, R. T. et al. Ethanol-responsive brain region expression networks: implications for behavioral responses to acute ethanol in DBA/2J versus C57BL/6J mice. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, n. 9, p. 2255–66, 2 mar. 2005.

KERSCHENSTEINER, M. et al. Activated Human T Cells, B Cells, and Monocytes Produce Brain-derived Neurotrophic Factor In Vitro and in Inflammatory Brain Lesions: A Neuroprotective Role of Inflammation? **Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 5, p. 865–870, 1 mar. 1999.

KIM, D.-J. et al. Effects of alcohol hangover on cytokine production in healthy subjects. **Alcohol**, v. 31, n. 3, p. 167–170, nov. 2003.

KLEIN, T. W. et al. The cannabinoid system and cytokine network. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)**, v. 225, n. 1, p. 1–8, out. 2000.

KLEIN, T. W. et al. The cannabinoid system and immune modulation. **Journal of leukocyte biology**, v. 74, n. 4, p. 486–96, out. 2003.

KOOB, G. F. **A role for GABA mechanisms in the motivational effects of alcohol** *Biochemical Pharmacology*, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295204005453>>. Acesso em: 23 jan. 2014

KOSIOREK, P. et al. Cannabinoids alter recognition memory in rats. **Polish journal of pharmacology**, v. 55, n. 5, p. 903–10, 2003.

KUNTSCHE, E.; REHM, J.; GMEL, G. Characteristics of binge drinkers in Europe. **Social Science & Medicine**, v. 59, n. 1, p. 113–127, 2004.

LARANJEIRA, R; PINSKI, I; ZALESKI, M; CAETANO, R; DUARTE, PCAV. I Levantamento acional sobre os Padrões de Consumo de Álcool na População Brasileira. Brasília: **SENAD – Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas**, 76 p, 2007.

LARANJEIRA, R. et al. II LENAD-Levantamento Nacional de Álcool e Drogas. **São Paulo: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas do Álcool e Outras Drogas. Universidade Federal de São Paulo**, 2012.

LAU, A. H.; ABE, M.; THOMSON, A. W. Ethanol affects the generation , cosignaling molecule expression , and function of plasmacytoid and myeloid dendritic cell subsets in vitro and in vivo. **Journal of leukocyte biology**, v. 79, n. May, p. 941–953, 2006.

LECOMTE, E. et al. Effect of alcohol consumption on blood antioxidant nutrients and oxidative stress indicators. **Am J Clin Nutr**, v. 60, n. 2, p. 255–261, 1 ago. 1994.

LEE, J. L. C.; EVERITT, B. J.; THOMAS, K. L. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 304, n. 5672, p. 839–43, 7 maio 2004.

LESSMANN, V.; GOTTMANN, K.; MALCANGIO, M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. **Progress in neurobiology**, v. 69, n. 5, p. 341–74, abr. 2003.

LEVI-MONTALCINI, R.; HAMBURGER, V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. **The Journal of experimental zoology**, v. 116, n. 2, p. 321–61, mar. 1951.

LICHTMAN, A. H. SR 141716A enhances spatial memory as assessed in a radial-arm maze task in rats. **European journal of pharmacology**, v. 404, n. 1-2, p. 175–9, 15 set. 2000.

LICHTMAN, A. H.; DIMEN, K. R.; MARTIN, B. R. Systemic or intrahippocampal cannabinoid administration impairs spatial memory in rats. **Psychopharmacology**, v. 119, n. 3, p. 282–90, jun. 1995.

LIEBER, C. S. Gastric ethanol metabolism and gastritis: interactions with other drugs, Helicobacter pylori, and antibiotic therapy (1957-1997)--a review. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 21, n. 8, p. 1360–6, nov. 1997.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, n. 2, p. 117–26, mar. 2000.

LIN, Y.-T. et al. Up-regulation of dorsal root ganglia BDNF and trkB receptor in inflammatory pain: an in vivo and in vitro study. **Journal of neuroinflammation**, v. 8, p. 126, jan. 2011.

LIU, J. et al. Activation and binding of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by synthetic cannabinoid ajulemic acid. **Molecular pharmacology**, v. 63, n. 5, p. 983–92, maio 2003.

LOGOTHETIS, N. K.; SHEINBERG, D. L. Visual object recognition. **Annual review of neuroscience**, v. 19, p. 577–621, jan. 1996.

LOGRIP, M. L.; JANAK, P. H.; RON, D. Escalating ethanol intake is associated with altered corticostriatal BDNF expression. **Journal of neurochemistry**, v. 109, n. 5, p. 1459–68, jun. 2009.

LUCAS, S.-M.; ROTHWELL, N. J.; GIBSON, R. M. The role of inflammation in CNS injury and disease. **British journal of pharmacology**, v. 147 Suppl , p. S232–40, jan. 2006.

MACLENNAN, A. J.; LEE, N.; WALKER, D. W. Chronic ethanol administration decreases brain-derived neurotrophic factor gene expression in the rat hippocampus. **Neuroscience letters**, v. 197, n. 2, p. 105–8, 8 set. 1995.

MADRUGA, C. S. et al. Use of licit and illicit substances among adolescents in Brazil- a national survey. **Addictive behaviors**, v. 37, n. 10, p. 1171–5, out. 2012.

MÄKELÄ, P. et al. Episodic heavy drinking in four Nordic countries: a comparative survey. **Addiction (Abingdon, England)**, v. 96, n. 11, p. 1575–88, nov. 2001.

MALLET, P. E.; BENINGER, R. J. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716A attenuates the memory impairment produced by delta9-tetrahydrocannabinol or anandamide. **Psychopharmacology**, v. 140, n. 1, p. 11–9, nov. 1998.

MANDREKAR, P. et al. Human monocyte IL-10 production is increased by acute ethanol treatment. **Cytokine**, v. 8, n. 7, p. 567–77, jul. 1996.

MANSOURI, A. et al. Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial dna in mouse liver, brain, heart, and skeletal muscles: protective effects of antioxidants. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 298, n. 2, p. 737–43, ago. 2001a.

MANSOURI, A. et al. Acute Ethanol Administration Oxidatively Damages and Depletes Mitochondrial DNA in Mouse Liver, Brain, Heart, and Skeletal Muscles: Protective Effects of Antioxidants. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 298, n. 2, p. 737–743, 1 ago. 2001b.

MARCO, E. M. et al. Long-term consequences of URB597 administration during adolescence on cannabinoid CB1 receptor binding in brain areas. **Brain research**, v. 1257, p. 25–31, 27 fev. 2009.

MARSICANO, G. et al. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. **Journal of neurochemistry**, v. 80, n. 3, p. 448–56, fev. 2002.

MATÉS, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, n. 1-3, p. 83–104, 16 nov. 2000.

MATSUMOTO, H.; FUJIMIYA, T.; FUKUI, Y. Role of alcohol dehydrogenase in rat ethanol elimination kinetics. **Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire). Supplement**, v. 29, n. 1, p. 15–20, jan. 1994.

MATSUMOTO, H.; FUKUI, Y. Pharmacokinetics of ethanol: a review of the methodology. **Addiction biology**, v. 7, n. 1, p. 5–14, jan. 2002.

MCCLAIN, C. J. et al. Cytokines in alcoholic liver disease. **Seminars in liver disease**, v. 19, n. 2, p. 205–19, jan. 1999.

MCCOY, S. I. et al. A trajectory analysis of alcohol and marijuana use among Latino adolescents in San Francisco, California. **The Journal of adolescent health : official publication of the Society for Adolescent Medicine**, v. 47, n. 6, p. 564–74, dez. 2010.

MCGOUGH, N. N. H. et al. RACK1 and brain-derived neurotrophic factor: a homeostatic pathway that regulates alcohol addiction. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 46, p. 10542–52, 17 nov. 2004.

MELONI NINO, J.; LARANJEIRA, R. Custo social e de saúde do consumo do álcool The Social and Health burden of alcohol abuse Resumo. v. 26, n. Supl I, p. 7–10, 2004.

MEUNIER, M. Effects of orbital frontal and anterior cingulate lesions on object and spatial memory in rhesus monkeys. **Neuropsychologia**, v. 35, n. 7, p. 999–1015, jul. 1997.

MILLER, M. W. Repeated episodic exposure to ethanol affects neurotrophin content in the forebrain of the mature rat. **Experimental neurology**, v. 189, n. 1, p. 173–81, set. 2004.

MILLER, M. W.; MOONEY, S. M. Chronic exposure to ethanol alters neurotrophin content in the basal forebrain-cortex system in the mature rat: effects on autocrine-paracrine mechanisms. **Journal of neurobiology**, v. 60, n. 4, p. 490–8, 15 set. 2004.

MILLER, P.; PLANT, M.; PLANT, M. Spreading out or concentrating weekly consumption: alcohol problems and other consequences within a UK population sample. **Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)**, v. 40, n. 5, p. 461–8, 2005.

MILLER, R. et al. The effects of chronic ethanol consumption on neurotrophins and their receptors in the rat hippocampus and basal forebrain. **Brain research**, v. 950, n. 1-2, p. 137–47, 20 set. 2002.

MONTOLIU, C. et al. Ethanol increases cytochrome P4502E1 and induces oxidative stress in astrocytes. **Journal of neurochemistry**, v. 65, n. 6, p. 2561–70, dez. 1995.

MOONAT, S. et al. Neuroscience of alcoholism: molecular and cellular mechanisms. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 67, n. 1, p. 73–88, jan. 2010.

MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 175, n. 1, p. 5–14, 1 jul. 2005.

MOTAGHEDI, R.; MCGRAW, T. E. The CB1 endocannabinoid system modulates adipocyte insulin sensitivity. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 16, n. 8, p. 1727–34, ago. 2008.

MYSKIW, J. C. et al. On the participation of mTOR in recognition memory. **Neurobiology of learning and memory**, v. 89, n. 3, p. 338–51, mar. 2008.

NAIMI, T. S. et al. Binge drinking in the preconception period and the risk of unintended pregnancy: implications for women and their children. **Pediatrics**, v. 111, n. 5 Pt 2, p. 1136–41, maio 2003.

NAKAMURA, E. M. et al. Reversible effects of acute and long-term administration of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) on memory in the rat. **Drug and alcohol dependence**, v. 28, n. 2, p. 167–75, ago. 1991.

NAKAMURA-PALACIOS, E. M. Working Memory and Prefrontal Cortex and Their Relation with the Brain Reward System and Drug Addiction. In: LEVIN, ES (Org.). **Working Memory: Capability, Developments and Improvement Techniques**. New York: NOVA Publishers, p. 109-140, 2011.

NESTLER, E. J. et al. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13–25, 28 mar. 2002.

NIXON, K.; MCCLAIN, J. A. Adolescence as a critical window for developing an alcohol use disorder: current findings in neuroscience. **Current opinion in psychiatry**, v. 23, n. 3, p. 227–32, maio 2010.

NORDMANN, R.; RIBIERE, C.; ROUACH, H. ETHANOL-INDUCED LIPID PEROXIDATION AND OXIDATIVE STRESS IN EXTRAHEPATIC TISSUES. **Alcohol Alcohol.**, v. 25, n. 2-3, p. 231–237, 1 jan. 1990.

O'MALLEY, P. M.; JOHNSTON, L. D.; BACHMAN, J. G. Alcohol use among adolescents. **Alcohol health and research world**, v. 22, n. 2, p. 85–93, jan. 1998.

ODDIAH, D. et al. Rapid increase of NGF, BDNF and NT-3 mRNAs in inflamed bladder. **Neuroreport**, v. 9, n. 7, p. 1455–8, 11 maio 1998.

OKAMOTO, H. et al. Effects of chronic ethanol administration on the expression levels of neurotrophic factors in the rat hippocampus. **Okajimas folia anatomica Japonica**, v. 83, n. 1, p. 1–6, maio 2006.

ORT, E. P. The World Health Report 2002. Reducing Risks, Promotion Healthy Life, Geneva, **WHO**, 2002.

OWENS, T. The enigma of multiple sclerosis: inflammation and neurodegeneration cause heterogeneous dysfunction and damage. **Current opinion in neurology**, v. 16, n. 3, p. 259–65, jun. 2003.

PACHER, P.; BÁTKAI, S.; KUNOS, G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. **Pharmacological reviews**, v. 58, n. 3, p. 389–462, set. 2006.

PAN, C.; YOO, H. J.; HO, L.-T. Perspectives of CB1 Antagonist in Treatment of Obesity: Experience of RIO-Asia. **Journal of obesity**, v. 2011, p. 957268, jan. 2011.

PASCUAL, M. et al. Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. **The European journal of neuroscience**, v. 25, n. 2, p. 541–50, jan. 2007.

PASCUAL, M. et al. Neuroimmune activation and myelin changes in adolescent rats exposed to high-dose alcohol and associated cognitive dysfunction: a review with reference to human adolescent drinking. **Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)**, v. 49, n. 2, p. 187–92, 2014.

PERTWEE, R. G. Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: from THC to anandamide and beyond. **Addiction biology**, v. 13, n. 2, p. 147–59, jun. 2008.

PESTKA, S.; KRAUSE, C. D.; WALTER, M. R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. **Immunological reviews**, v. 202, p. 8–32, dez. 2004.

PFEFFERBAUM, A. et al. A controlled study of cortical gray matter and ventricular changes in alcoholic men over a 5-year interval. **Archives of general psychiatry**, v. 55, n. 10, p. 905–12, out. 1998.

PINSKY, I. et al. Patterns of alcohol use among Brazilian adolescents. **Revista brasileira de psiquiatria (São Paulo, Brazil : 1999)**, v. 32, n. 3, p. 242–9, set. 2010.

PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 4, n. 11, p. 873–84, nov. 2003.

PIOMELLI, D. et al. Pharmacological profile of the selective FAAH inhibitor KDS-4103 (URB597). **CNS drug reviews**, v. 12, n. 1, p. 21–38, jan. 2006.

POHORECKY, L. A.; BRICK, J. Pharmacology of ethanol. **Pharmacology & therapeutics**, v. 36, n. 2-3, p. 335–427, jan. 1988.

POO, M. M. Neurotrophins as synaptic modulators. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 2, n. 1, p. 24–32, jan. 2001.

PRUETT, S. B. et al. Suppression of innate immunity by acute ethanol administration: a global perspective and a new mechanism beginning with inhibition of signaling through TLR3. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, n. 4, p. 2715–24, 15 ago. 2004.

RAEBURN, C. D. et al. Cytokines for surgeons. **American journal of surgery**, v. 183, n. 3, p. 268–73, mar. 2002.

RAGOZZINO, M. E.; DETRICK, S.; KESNER, R. P. The effects of prelimbic and infralimbic lesions on working memory for visual objects in rats. **Neurobiology of learning and memory**, v. 77, n. 1, p. 29–43, jan. 2002.

RAIVIO, N. et al. Brain-derived neurotrophic factor expression after acute administration of ethanol. **European journal of pharmacology**, v. 687, n. 1-3, p. 9–13, 15 jul. 2012.

RAMACHANDRAN, V. et al. Ethanol-induced oxidative stress precedes mitochondrially mediated apoptotic death of cultured fetal cortical neurons. **Journal of neuroscience research**, v. 74, n. 4, p. 577–88, 15 nov. 2003.

REHM, J. et al. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. **Lancet**, v. 373, n. 9682, p. 2223–33, 27 jun. 2009.

REICHARDT, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 361, n. 1473, p. 1545–64, 29 set. 2006.

RENIS, M. et al. Nuclear DNA strand breaks during ethanol-induced oxidative stress in rat brain. **FEBS letters**, v. 390, n. 2, p. 153–6, 22 jul. 1996.

REYNOLDS, A. et al. Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. **International review of neurobiology**, v. 82, p. 297–325, jan. 2007.

RIESENHUBER, M.; POGGIO, T. Neural mechanisms of object recognition. **Current opinion in neurobiology**, v. 12, n. 2, p. 162–8, abr. 2002.

ROBERTS, A. J. et al. mu-Opioid receptor knockout mice do not self-administer alcohol. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 293, n. 3, p. 1002–8, jun. 2000.

ROCKWELL, C. E. et al. Interleukin-2 suppression by 2-arachidonyl glycerol is mediated through peroxisome proliferator-activated receptor gamma independently of cannabinoid receptors 1 and 2. **Molecular pharmacology**, v. 70, n. 1, p. 101–11, jul. 2006.

ROCKWELL, C. E.; KAMINSKI, N. E. A cyclooxygenase metabolite of anandamide causes inhibition of interleukin-2 secretion in murine splenocytes. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 311, n. 2, p. 683–90, nov. 2004.

RODRIGUES, L. C. DE M.; CONTI, C. L.; NAKAMURA-PALACIOS, E. M. Clozapine and SCH 23390 prevent the spatial working memory disruption induced by Δ^9 -THC administration into the medial prefrontal cortex. **Brain research**, v. 1382, p. 230–7, 25 mar. 2011.

ROSSATO, J. I. et al. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 14, n. 1, p. 36–46, 1 jan. 2007.

ROSSO, R. Avaliação das propriedades antioxidantes de derivados ésteres do ácido gálico. **Tese de mestrado em farmácia - Universidade Federal de Santa Catarina**. Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. 153p, 2005.

SALASPURO, V. et al. Ethanol oxidation and acetaldehyde production in vitro by human intestinal strains of *Escherichia coli* under aerobic, microaerobic, and anaerobic conditions. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 34, n. 10, p. 967–73, out. 1999.

SARI, Y.; ZHOU, F. C. Prenatal Alcohol Exposure Causes Long-Term Serotonin Neuron Deficit in Mice. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 28, n. 6, p. 941–948, 3 jun. 2004.

SCHERMA, M. et al. The endogenous cannabinoid anandamide has effects on motivation and anxiety that are revealed by fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 1, p. 129–40, jan. 2008.

SCIVOLETTO, S. et al. Relação entre consumo de drogas e comportamento sexual de estudantes de 2o grau de São Paulo. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, n. 2, p. 87–94, jun. 1999.

SCOLARO, B. et al. Mate tea prevents oxidative stress in the blood and hippocampus of rats with acute or chronic ethanol administration. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2012, p. 314758, jan. 2012.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 227–236, jun. 2004.

SHIMIZU, E. et al. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. **Biological psychiatry**, v. 54, n. 1, p. 70–5, 1 jul. 2003.

SHIRAYAMA, Y. et al. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 8, p. 3251–61, 15 abr. 2002.

SILVEIRA, C. M. et al. Epidemiology of heavy drinking and heavy episodic drinking in Brazil: a systematic review of literature. **Rev. psiquiatr. clín. (São Paulo)**, v. 35, n. supl.1, p. 31–38, 2008.

SOLDERA, M. et al. [Heavy alcohol use among elementary and high-school students in downtown and outskirts of Campinas City-São Paulo: prevalence and related factors]. **Revista brasileira de psiquiatria (São Paulo, Brazil : 1999)**, v. 26, n. 3, p. 174–9, set. 2004.

SOMANI, S. M. et al. Interaction of exercise and ethanol on antioxidant enzymes in brain regions of the rat. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 13, n. 6, p. 603–10, 1996a.

SOMANI, S. M. et al. Interaction of exercise and ethanol on antioxidant enzymes in brain regions of the rat. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 13, n. 6, p. 603–10, 1 jan. 1996b.

SOUZA, D. P. O. DE; SILVEIRA FILHO, D. X. DA. Uso recente de álcool, tabaco e outras drogas entre estudantes adolescentes trabalhadores e não trabalhadores. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 10, n. 2, p. 276–287, jun. 2007.

SOWELL, E. R. et al. In vivo evidence for post-adolescent brain maturation in frontal and striatal regions. **Nature neuroscience**, v. 2, n. 10, p. 859–61, out. 1999.

SPINETTA, M. J. et al. Alcohol-induced retrograde memory impairment in rats: prevention by caffeine. **Psychopharmacology**, v. 201, n. 3, p. 361–71, dez. 2008.

STAHEL, P. F. et al. Peroxisome proliferator-activated receptors: “key” regulators of neuroinflammation after traumatic brain injury. **PPAR research**, v. 2008, p. 538141, jan. 2008.

STOLLE, M.; SACK, P.-M.; THOMASIUS, R. Binge drinking in childhood and adolescence: epidemiology, consequences, and interventions. **Deutsches Ärzteblatt international**, v. 106, n. 19, p. 323–8, maio 2009.

STRAUCH, E. S. et al. Alcohol use among adolescents: a population-based study. **Revista de saúde pública**, v. 43, n. 4, p. 647–55, ago. 2009.

SUN, A. Y.; SUN, G. Y. Ethanol and oxidative mechanisms in the brain. **Journal of biomedical science**, v. 8, n. 1, p. 37–43, 2001.

SUN, Y. et al. Cannabinoids and PPARalpha signalling. **Biochemical Society transactions**, v. 34, n. Pt 6, p. 1095–7, dez. 2006.

SZABO, G. et al. Effect of ethanol on inflammatory responses. Implications for pancreatitis. **Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]**, v. 7, n. 2-3, p. 115–23, jan. 2007.

HUANG, E J CARLSON, A M GILLESPIE, Y SHI, C. J. E. Ubiquitous overexpression of CuZn superoxide dismutase does not extend life span in mice. **The Journals of**

Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences, v. 55, n. 1, p. B5–B9, 1 jan. 2000.

TAPIA-ARANCIBIA, L. et al. Effects of alcohol on brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in discrete regions of the rat hippocampus and hypothalamus. **Journal of neuroscience research**, v. 63, n. 2, p. 200–8, 15 jan. 2001.

TAVARES, B. F. Prevalência do uso de drogas e desempenho escolar entre adolescentes. **Rev Saúde Pública**, v. 35, n. 2, p. 150-8, 2001.

TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. **Physiological reviews**, v. 86, n. 2, p. 515–81, abr. 2006.

THOMPSON, P. M. et al. Structural abnormalities in the brains of human subjects who use methamphetamine. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 26, p. 6028–36, 30 jun. 2004.

TIBIRIÇA, E. The multiple functions of the endocannabinoid system: a focus on the regulation of food intake. **Diabetology & metabolic syndrome**, v. 2, p. 5, jan. 2010.

TOGA, A. W.; THOMPSON, P. M.; SOWELL, E. R. Mapping brain maturation. **Trends in neurosciences**, v. 29, n. 3, p. 148–59, mar. 2006.

TULVING; E. Episodic and semantic memory. **Organization of memory**. New York: Academic press:381-403, 1972 .

UYLINGS, H. B.; VAN EDEN, C. G. Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. **Progress in brain research**, v. 85, p. 31–62, jan. 1990.

VALLES, S. L. et al. Chronic ethanol consumption enhances interleukin-1-mediated signal transduction in rat liver and in cultured hepatocytes. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 27, n. 12, p. 1979–86, dez. 2003.

VALLÉS, S. L. et al. Chronic ethanol treatment enhances inflammatory mediators and cell death in the brain and in astrocytes. **Brain pathology** (Zurich, Switzerland), v. 14, n. 4, p. 365–71, out. 2004.

VAN STRIEN, N. M.; CAPPAERT, N. L. M.; WITTER, M. P. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 10, n. 4, p. 272–82, abr. 2009.

VARELLA, P. P. V; FORTE, W. C. N. Citokines: a review. **Rev. bras. alergía imunopatol**, v. 24, n. 4, p. 146–154, 2001.

VERTES, R. P. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. **Neuroscience**, v. 142, n. 1, p. 1–20, 29 set. 2006.

VETRENO, R. P.; CREWS, F. T. Adolescent binge drinking increases expression of the danger signal receptor agonist HMGB1 and Toll-like receptors in the adult prefrontal cortex. **Neuroscience**, v. 226, p. 475–88, 13 dez. 2012.

VIEIRA, D. L. et al. Álcool e adolescentes: estudo para implementar políticas municipais. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n. 3, p. 396–403, jun. 2007.

WALTER, L.; STELLA, N. Cannabinoids and neuroinflammation. **British journal of pharmacology**, v. 141, n. 5, p. 775–85, mar. 2004.

WANG, P. et al. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 16, p. 9558–63, 21 abr. 1995.

WARD, R. J.; JUTLA, J.; PETERS, T. J. Antioxidants status in alcoholic liver disease. **Adv Biosci.** 1989; 76(5): 343-51.

WHITE, A. M. What happened? Alcohol, memory blackouts, and the brain. **Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism**, v. 27, n. 2, p. 186–96, jan. 2003.

WHITE, A. M.; SWARTZWELDER, H. S. Age-related effects of alcohol on memory and memory-related brain function in adolescents and adults. **Recent developments in alcoholism: an official publication of the American Medical Society on Alcoholism, the Research Society on Alcoholism, and the National Council on Alcoholism**, v. 17, p. 161–76, jan. 2005.

W.H.O. Global Status Report on Alcohol and Health 2011. Disponível em: <http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/m_sbgstrupprofiles.pdf>.

WILSON, R. I.; KUNOS, G.; NICOLL, R. A. Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus. **Neuron**, v. 31, n. 3, p. 453–62, 16 ago. 2001.

WINDLE, M. Alcohol use among adolescents and young adults. **Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism**, v. 27, n. 1, p. 79–85, jan. 2003.

WOOD, J. N.; GRAFMAN, J. Human prefrontal cortex: processing and representational perspectives. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 4, n. 2, p. 139–47, fev. 2003.

XU, J.-Y.; CHEN, C. Endocannabinoids in Synaptic Plasticity and Neuroprotection. **The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, 25 fev. 2014.

ZAHR, N. M. et al. Measurement of serum, liver, and brain cytokine induction, thiamine levels, and hepatopathology in rats exposed to a 4-day alcohol binge

protocol. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 34, n. 11, p. 1858–70, nov. 2010.

ZANOTI-JERONYMO, D. V.; CARVALHO, A. M. P. Self-concept, academic performance and behavioral evaluation of the children of alcoholic parents. **Revista brasileira de psiquiatria (São Paulo, Brazil : 1999)**, v. 27, n. 3, p. 233–6, set. 2005.

ZHANG, J.-M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **International anesthesiology clinics**, v. 45, n. 2, p. 27–37, jan. 2007.

ZHANG, L. et al. Effects of chronic ethanol administration on expression of BDNF and trkB mRNAs in rat hippocampus after experimental brain injury. **Brain research. Molecular brain research**, v. 79, n. 1-2, p. 174–9, 23 jun. 2000.

ZHAO, H. et al. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. **Free radical biology & medicine**, v. 34, n. 11, p. 1359–68, 1 jun. 2003.

ZHOU, F. C.; SARI, Y.; POWROZEK, T. A. Fetal Alcohol Exposure Reduces Serotonin Innervation and Compromises Development of the Forebrain Along the Serotonergic Pathway. **Alcoholism: Clinical & Experimental Research**, v. 29, n. 1, p. 141–149, jan. 2005.

ZUARDI, A. W. History of cannabis as a medicine: a review. **Revista brasileira de psiquiatria (São Paulo, Brazil : 1999)**, v. 28, n. 2, p. 153–7, jun. 2006.